
Regulation der Phytaseexpression in *Bacillus amyloliquefaciens*

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von
Dipl. Biol. Oliwia Makarewicz
geboren am 31.07.1974 in Schwerin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD.

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Rainer Borriss
2. Prof. Dr. Jörg Stülke
3. PD. Dr. Thomas Eitinger

eingereicht am: 28.06.06
Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.06

Zusammenfassung

Die Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* gehört zur Klasse der β -Propeller-Phytrasen. Obwohl das Protein selbst bereits näher charakterisiert und dessen Kristallstruktur als erste dieser Klasse aufgeklärt wurde, hat man sich bislang in der Literatur nicht mit der Regulation der β -Propeller-Phytrasen aus *Bacillus* Spezies befasst. Diese Arbeit stellt als erste ein Modell der Regulation von *phyC* in *Bacillus* vor.

In dieser Arbeit wurden zwei Regulatoren des *phyC*-Gens identifiziert. Eine hemmende Wirkung durch AbrB über zwei Bereiche, die ‚upstream‘ von –147 und ‚downstream‘ von +29 liegen, konnte nachgewiesen werden. Ein weiterer Regulator PhoP, der die Phosphatmangelantwort in *Bacillus* initiiert, ist für die Aktivierung des Phytasegens zuständig. Als höher geschalteter Regulator vermittelt PhoP die Bindung der RNA-Polymerase an die –10 Region über das ungewöhnlich große Fenster zwischen den Promotorstrukturen, indem es an zwei PhoP-Boxen bei –35 und –45 bindet. Darüber hinaus konnte eine duale Rolle von PhoP in der *phyC*-Regulation gezeigt werden, denn es hemmt gleichzeitig das Gen durch Bindung an die –10 Region und senkt so die Transkriptionsrate.

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	zweifach entionisiertes Wasser
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CIAP	'Calf Intestine Alkaline Phosphatase'
Cm	Chloramphenicol
Dig	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
HK	Hauptkultur
HPM	'High Phosphate Medium'
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
Km	Kanamycin
LPM	'Low Phosphate Medium'
NBT	Nitro-blue-tetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-beta-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotidkinase
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SOE	'Splicing by Overlapping Extension'
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAP	'Tabacco Acid Pyrophosphatase'
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Phytasen	1
	Phytat und die Bedeutung von Phytasen	1
	Phytaseklassen bei Mikroorganismen und Phytatabbau.....	2
1.2	<i>phyC</i> -Genstruktur in <i>Bacillus</i> Spezies.....	4
1.3	Welche Regulatoren kommen in Frage für die <i>phyC</i> -Regulation?.....	5
1.3.1	<i>Inositolstoffwechsel</i>	6
1.3.2	<i>Die Katabolitrepression</i>	7
1.3.3	<i>Die Phosphatmangelantwort</i>	9
1.3.4	<i>Das regulatorische Netzwerk der transienten Phase bei B. subtilis</i>	10
	Der Masterregulator SpoOA	11
	Der globale Regulator AbrB.....	12
1.4	Zielsetzung	14
2	ERGEBNISSE.....	15
2.1	Expressionsversuche	15
2.1.1	<i>Expression von phyC unter verschiedenen Wachstumsbedingungen</i>	15
	<i>Bacillus subtilis</i> als Wirt für die Untersuchungen der <i>phyC</i> -Expression..	15
	Die <i>phyC</i> -Expression in Abhängigkeit vom Phosphatangebot	16
	Einfluss der C-Quelle auf die <i>phyC</i> -Expression	18
	Die <i>phyC</i> -Expression nach Stressinduktion	20
2.1.2	<i>Abhängigkeit der phyC-Expression von verschiedenen Regulatoren</i>	21
	Einfluss von PhoP auf die <i>phyC</i> -Expression	21
	Auswirkungen der <i>ccpA</i> -Mutation auf die <i>phyC</i> -Promotoraktivität.....	22
	Vergleich der <i>phyC</i> -Expression in <i>spoOA</i> -, <i>abrB</i> - und <i>abrBspoOA</i> -	
	Mutanten	23
2.2	Organisation des <i>phyC</i> -Gens aus <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB45.....	24
	Das <i>phyC</i> -Gen.....	24
	Ermittlung des Transkriptionsstarts	25
	Analyse des Terminators	26
2.3	<i>In vivo</i> Untersuchungen der Bindung von PhoP, RNA-Polymerase und AbrB an	
	den <i>phyC</i> -Promotor	28

2.3.1	<i>Effekt von Promotorverkürzungen auf die Reporteraktivität</i>	28
	Expression im Wildtyp-Hintergrund.....	29
	Expression im <i>spo0A</i> - Hintergrund	30
2.3.2	<i>Auswirkung von Basensubstitutionen auf die Reporteraktivität</i>	31
	Die -10 Region	31
	Die PhoP-Box an der -10 Region.....	32
	Die -35 Region und das PhoP-Tandemmotiv	33
2.3.3	<i>Reporteraktivität in Deletionsmutanten</i>	34
2.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen der Bindung von PhoP, RNA-Polymerase und AbrB an den <i>phyC</i> -Promotor	36
2.4.1	<i>Bindung der Proteine an phyC in Gelretardations-Assays</i>	36
	Bindung von PhoP und PhoP~P an den Promotor.....	36
	Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor.....	37
	Bindung von AbrB den <i>phyC</i> -Promotor	38
2.4.2	<i>In vitro</i> Transkription von <i>phyC</i>	39
	Aktivierung der Transkription durch PhoP.....	39
	Transkriptionsrate bei hohen PhoP~P-Konzentrationen.....	39
	Hemmung der Transkription durch AbrB.....	40
2.4.3	<i>DNaseI-Footprints zur Analyse der Bindemotive</i>	41
	Bestätigung der PhoP-Bindemotive	42
	Bindungseffizienz der RNAP	43
	PhoP-Interaktion mit mutagenisierten Promotorstrukturen.....	45
3	DISKUSSION	47
3.1	Wie interagiert AbrB mit <i>phyC</i> ?	47
	AbrB reprimiert die <i>phyC</i> -Expression	47
	Modell der Repression durch AbrB: eine Wechselwirkung mit benachbartem <i>yodU</i> -Gen?.....	48
	Wie wird <i>yodU</i> reguliert?	50
3.2	Der <i>phyC</i> -Promotor.....	51
	<i>phyC</i> besitzt einen untypischen σ^A - abhängigen Promotor	51
	Kann man einen starken konstitutiven <i>phyC</i> -Promotor erzeugen?.....	53
3.3	Wie wird <i>phyC</i> durch PhoP aktiviert?	53
	Phytase ist Teil des Pho-Regulons	53

	PhoP hat eine duale Rolle in der <i>phyC</i> -Regulation	54
	Modell der Aktivierung des <i>phyC</i> -Promotors durch PhoP~P	57
	Wie interagieren PhoP und RNAP miteinander?	59
3.4	Lässt sich das Modell der <i>phyC</i> -Regulation auf andere <i>Bacillus</i> Spezies erweitern?	60
4	MATERIAL	63
4.1	Nukleotide und Oligonukleotide (Primer)	63
4.2	Plasmide	65
4.3	Stämme	66
4.4	Enzyme und andere Proteine	68
4.5	Antibiotiker und Substrate	69
4.6	Puffer und Lösungen	70
4.7	Medien	72
4.8	Sonstiges	73
4.9	Geräte	74
5	METHODEN	76
5.1	Mikrobiologische Methoden	76
5.1.1	<i>Stammhaltung von Kulturen</i>	76
5.1.2	<i>Kultivierung</i>	76
	Selektion der Transformanten	76
	Zellkulturen für Enzym-Assay	76
	Zellkulturen für Proteinreinigung	76
5.1.3	<i>Herstellung kompetenten Zellen und Transformation</i>	76
	Ca ²⁺ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	76
	Elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen und Elektroporation	77
	Transformation von XL2-Blue Ultrakompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	77
	Herstellung und Transformation natürlich-kompetenter <i>B. subtilis</i> -Zellen	77
5.1.4	<i>Zellaufschluss</i>	77
5.2	Gentechnische Methoden	77
5.2.1	<i>Stammhaltung von Nukleinsäuren</i>	77
5.2.2	<i>Amplifikation</i>	77
	Kolonie-PCR	77
	Standard-PCR	78

	SOE-PCR.....	78
	RT-PCR	78
	„Site directed“ Mutagenese	78
5.2.3	<i>Ligationen</i>	78
	Standard-DNA-Ligation	78
	Ligation in pGEMT	79
5.2.4	<i>DNA-Fällungen</i>	79
	NaAcetat/Ethanol-Fällung	79
	Ethanol-Fällung	79
	Isopropanol-Fällung	79
5.2.5	<i>Isolierung von Nukleinsäuren</i>	79
	Isolierung chromosomaler DNA	79
	Isolierung von gesamt-RNA	79
	Plasmidpräparationen	80
	Reinigung von Nukleinsäuren	80
5.2.6	<i>Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration</i>	80
5.2.7	<i>Dephosphorylierung der DNA</i>	80
5.2.8	<i>Restriktionen</i>	81
5.2.9	<i>5' RACE</i>	81
5.2.10	<i>Northern-Blot</i>	81
5.2.11	<i>Markierung der DNA</i>	82
	Nichtradioaktive Markierung mit Dig-dUTP	82
	Radioaktive Markierung mit [γ^{32} -P]dATP	82
5.2.12	<i>Gelretardations-Assay</i>	82
5.2.13	<i>DNaseI-Footprinting</i>	82
5.2.14	<i>In vitro Transkription</i>	83
5.2.15	<i>Primerextension</i>	83
5.2.16	<i>Konstruktion von Plasmiden und Stämmen</i>	83
	pOM-Plasmide	83
	pCUT-Plasmide	83
	pMUT-Plasmide	84
	pDEL-Plasmide	84
	pPHOP-Plasmid	84
	pPHOR231-Plasmid	84

pABRB-Plasmid	84
OM-Stämme	84
MUT-Stämme.....	85
DEL-Stämme	85
Herstellung der <i>abrB</i> und <i>abrBspoOA</i> -Mutanten	85
5.3 Sequenzierung von DNA.....	85
5.3.1 Sequenzierungsreaktion zur Bestätigung der Genotypen.....	85
5.3.2 G+A Maxam und Gilbert Sequenzierungsreaktion.....	85
5.4 Biochemische Methoden.....	85
5.4.1 Reinigung der Proteine.....	85
Reinigung von PhoP	85
Reinigung von PhoR231.....	86
Reinigung der RNA-Polymerase	86
Reinigung von AbrB.....	86
5.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	86
5.4.3 Phosphatbestimmung	86
5.4.4 Enzym-Assays.....	87
β -Galaktosidase-Assay.....	87
APase-Assay	87
Phosphorylierungsassay von PhoP	87
5.4.5 SDS-PAGE.....	87
5.4.6 Western-Blot.....	87
5.4.7 Thrombinverdau zur Entfernung des His-Tag.....	88
5.5 Software	88
6 REFERENZEN	89
7 ANHANG	97
7.1 Weitere Abbildungen	97
7.2 Alignments.....	99
7.2.1 CLUSTAL W (1.82) Multiples Sequenz-Alignment	99
7.2.2 Vergleiche der Proteinsequenzen aus <i>B. subtilis</i> und <i>B. amyloliquefaciens</i>	104
7.3 Sequenz des <i>phyC</i> -Gens aus <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB45	106

1 Einleitung

Phytasen (*myo*-Inositolhexakisphosphat-Phosphohydrolasen) sind spezielle Phosphatasen, denn sie katalysieren die Hydrolyse von *myo*-Inositolhexakisphosphat (Phytat) zu niedrigeren Phosphateestern des *myo*-Inositols und Orthophosphaten. Sie wurden in zahlreichen Mikroorganismen wie auch bei höheren Organismen nachgewiesen. Obwohl viele dieser Proteine näher charakterisiert wurden, befasst sich die Literatur nur wenig mit der Regulation der Phytasegene.

1.1 Phytasen

Phytat und die Bedeutung von Phytasen

Phytat kommt als häufigste Speicherform von Phosphaten in Samen höherer Pflanzen vor. Insbesondere in Getreide und Leguminosen, die zu den wichtigsten Nahrungsmitteln für Mensch und Tier gehören, macht es bis zu 80 % des Gesamtphosphors aus (Reddy *et al.*, 1982). Auf Grund der hohen negativen Ladung der Phosphatgruppen ist Phytat ein starker Chelatbildner und bindet divalente Metallionen wie Zink (Lönnerdal *et al.*, 1988), Eisen (Brune *et al.*, 1992) und Calcium (Heaney *et al.*, 1991). Es komplexiert ebenfalls Aminosäuren und Proteine (Reddy *et al.*, 1982). Da monogastrische Tiere nicht über Phytat spaltende Enzyme verfügen, können sie das Phytat nicht verdauen (Common, 1989), was einen nährstoffentziehenden Effekt mit sich bringt (Mega, 1982, Torre *et al.*, 1991). Damit ist auch das im Phytat gebundene Phosphat nicht zugänglich, weshalb beim Verfüttern von phytatreicher Nahrung z. B. in der Massentierhaltung, diese mit Phosphaten angereichert werden muss. Dies hat zu Folge, dass nicht adsorbiertes Phosphat und Phytat über die Exkremente ins Grundwasser gelangen können. Mikroorganismen, die das Phytat spalten, setzen zusätzliche Phosphate frei. Gelangt Phosphat ins Oberflächenwasser, wird es organisch gebunden und trägt zu Eutrophierung bei (Yanke *et al.*, 1998, Pen *et al.*, 1993). Deshalb gilt das Hauptinteresse dem Einsatz von Phytasen in der Tierernährung. Damit lassen sich die ökologischen Folgen der ‚Phosphatverschmutzung‘ in Grenzen halten, außerdem muss das Futter nicht mehr so stark mit anorganischen Phosphaten angereichert werden, was die Kosten senkt. Der Entzug von Mineralien und wichtigen Aminosäuren aus dem Futter wird ebenfalls gemindert (Broz *et al.*, 1994, Sandberg, 1996, Pen *et al.*, 1993).

Phytasen sind nicht nur wegen wirtschaftlicher und ökologischer Bedeutung interessant. Einige Isomere der Zwischenprodukte des Phytatabbaus sind Bestandteile des Phosphatidylinositol-Cyclus und spielen intrazellulär eine wichtige Rolle als sekundäre Messenger (Berridge und Irvine, 1984), anderen wird eine pharmazeutische Wirkung zugesprochen (Siren *et al.*, 1991). Unlängst wurde festgestellt, dass sowohl Phytat als auch niedrigere Phosphatester des *myo*-Inositols eine wichtige Rolle in der eukaryotischen Zellphysiologie spielen. Es wurde eine Wirkung von Phytat und InsP_5 bei der Neurotransmission (Sasakawa *et al.*, 1995) sowie bei der Endo- und Exocytose (Efanov *et al.*, 1997) gezeigt. Phytat hat außerdem einen Einfluss auf die Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung und ist deshalb als Antikarzinogen (Baten *et al.*, 1989, Shamsuddin *et al.*, 1997 und 2002) neben anderen biologisch aktiven Naturverbindungen von großem medizinischen Interesse. Auch eine Pflanzenwachstum stimulierende Wirkung durch Phytasen, die wahrscheinlich auf der Mobilisierung von Phosphaten beruht, konnte nachgewiesen werden (Findenegg und Nelemans, 1993, Idriss *et al.*, 2002).

Phytaseklassen bei Mikroorganismen und Phytatabbau

Phytasegene wurden in einer Vielzahl von Mikroorganismen gefunden und deren Zahl wächst weiter. Zu den Gram-positiven Vertretern gehören unter anderem *B. subtilis* (Kerovuo *et al.*, 1998) und *Bacillus amyloliquefaciens* (Kim *et al.*, 1998, Idriss *et al.*, 2002), unter den Gram-negativen Vertretern sind *E. coli* (Dassa *et al.*, 1990), *Klebsiella terrigena* (Greiner *et al.*, 1997), *Pseudomonas* sp. (Richardson und Hadobas, 1997) und *Enterobacter* sp. (Yoon *et al.*, 1996) zu nennen. Auch in probiotischen Mikroorganismen, wie *Lactobacillus plantarum* (Zamudio *et al.*, 2001) und *Bifidobacterium* spp. (Haros *et al.*, 2005) wurden Phytaseaktivitäten gemessen. Auch Pilze bilden Phytasen, hier sind vor allem *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus* zu erwähnen (Wodzinski und Ullah, 1996, Pasamontes *et al.*, 1997, Wyss *et al.*, 1998).

Phytasen können auf Grund ihrer chemischen und morphologischen Eigenschaften in vier Klassen eingeteilt werden: saure Histidinphosphatasen, saure Purpurphosphatasen, β -Propeller-Phytasen und Cystein-Phytasen (Mullaney und Ullah, 2003). Innerhalb der Phytasen zeigen die β -Propeller-Phytasen keinerlei Ähnlichkeiten zu den übrigen, sowohl strukturell als auch biochemisch. Sie besitzen die höchsten Aktivitäten bei neutralen bis basischen pH-Werten und Temperaturen von 50°C,

wohingegen die anderen Phytasegruppen im sauren Bereichen und bei 37 °C aktiv sind. Sie hydrolysieren Phytat nur bis zum *myo*-Inositoltrisphosphat (InsP₃). Die Hydrolyse erfolgt schrittweise, dabei werden die Phosphatgruppen an alternierenden C-Atomen abgespalten: Ins(1,2,4,5,6)P₅ → Ins(2,4,5,6)P₄ → Ins(2,4,6)P₃ (Greiner persönliche Mitteilung, Artikel im Druck). *E. coli* und *Aspergillus* Spezies, deren Phytasen zu den sauren Histidinphosphatasen gehören (Mitchell et al., 1997), bauen Phytat vorzugsweise bis zum *myo*-Inositol-2-monophosphat (Ins(2)P₁) ab. Der Abbauweg der *E. coli* Phytase wurde ebenfalls aufgeklärt: Ins(1,2,3,4,5)P₅ → Ins(2,3,4,5)P₄ → Ins(2,4,5)P₃ → Ins(2,5)P₂ → Ins(2)P (Greiner et al., 2001).

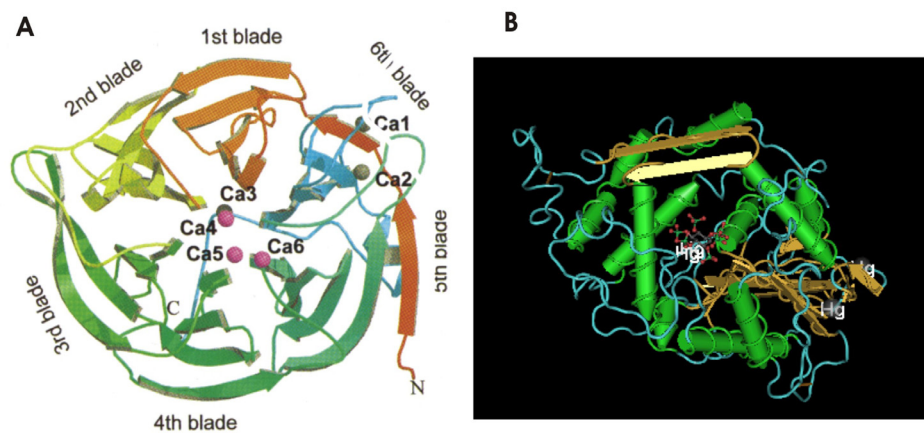


Abbildung 1.1: **Röntgen-Kristallstrukturen der Phytasen aus *B. amyloliquefaciens* und *E. coli***; (A) *B. amyloliquefaciens* Phytase weist eine 7-schneidige Propellerstruktur auf, N-terminal befindet sich das Signalpeptid (rot), die einzelnen ‚Schneiden‘ bestehen aus β-Faltblättern und sind mit unterschiedlichen Farben dargestellt, in dem aktiven Zentrum (Mitte) befinden sich 4 Calciumionen (rosa, Ca3, Ca4, Ca5 und Ca6), zwei weitere Calciumionen sind an der sechsten ‚Schneide‘ gebunden (grau, Ca1 und Ca2). (B) Die *E. coli* Phytase ist eher ein globuläres Protein mit 11 α-Helices und 7 β-Faltblattstrukturen, hier die Kristallstruktur mit Quecksilberionen und Phytat im aktiven Zentrum (rot). (A) nach Shin et al., 2001, (B) nach Lim et al., 2000.

Die Bezeichnung β-Propeller-Phytasen bezieht sich auf die auffällige Proteinstruktur. Die Kristallstruktur der Phytase aus *B. amyloliquefaciens* wurde als erste ermittelt (Ha et al., 2000 und Shin et al., 2001), sie ähnelt, abgesehen von dem N-terminalen Signalpeptid, einem Propeller mit sechs Schneiden. Jede dieser Schneiden besteht aus vier bis fünf antiparallelen β-Faltblättern, die miteinander in topologisch identischer Weise verbunden sind. Dabei ist jeweils das letzte β-Faltblatt der einen Schneide mit dem ersten der nächsten verbunden (Abbildung 1.1 A). Die Kristallstrukturen der *E. coli* Phytase (Abbildung 1.1 B), wie auch der *Aspergillus* Phytase weisen hingegen eher eine globuläre Form auf.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass die β -Propeller-Phytasen nur bei Gram-positiven Bakterien vorkommen. Unlängst wurde aber ein Vertreter der Gram-negativen Bakterien (*Shewanella oneidensis*) entdeckt, dessen Phytasesequenz bis zur 30 % Homologie zur der β -Propeller-Phytase aus *B. amyloliquefaciens* aufweist (Cheng und Lim, 2006). Das legt die Vermutung nahe, dass die β -Propeller-Phytasen doch weiter verbreitet sein könnten, als bis lang angenommen.

1.2 *phyC*-Genstruktur in *Bacillus* Spezies

Obwohl so viele Phytasen untersucht wurden, ist erstaunlich wenig über die Regulation der Phytasegene bekannt. Bislang wurden vor allem einige Phytasegene der Gram-positiven Vertreter erforscht. Für das *E. coli appA* Gen (Phytase) wurde gezeigt, dass es von zwei Promotoren transkribiert wird: P_{appA} , das vor dem *appA*-Strukturgen liegt und P_{cyx} . Dieser Promotor liegt vor dem Operon *cyxAB*, das wiederum befindet sich ‚upstream‘ von *appA* und kodiert für Untereinheiten der Cytochromoxidase d (Dassa et al., 1991). P_{cyx} wird durch Sauerstoff- und Phosphatmangel, sowie den globalen Regulator AppY aktiviert. Die Regulation des P_{appA} ist noch unklar (Atlung und Brøndsted, 1994). Eine Abhängigkeit vom Phosphatregulon wurde nicht festgestellt (Touati und Danchin, 1987).

Über die Regulation in Gram-positiven Bakterien ist nichts bekannt. Die Organisation des *phyC* aus *Bacillus* Spezies ist anders als bei *E. coli*. Das Gen ist monocistronisch. In *Bacillus subtilis* 168 liegt das *phyC*-Gen (*yzxA*) zwischen den Operon *cgeAB* (downstream) und *yodU* (upstream), wobei *yzxA* zu den beiden anderen ‚coding sites‘ entgegengesetzt kodiert (siehe auch Abbildung 7.7). Die Funktion der umgebenden Gene ist nicht geklärt, wobei *cgeAB* und das divergente Operon *cgeCDE* unter der Kontrolle von GerE stehen. Es wird angenommen, dass diese Gene für die Reifung der äußersten Sporenschicht zuständig sind (Roels und Losick, 1995). YodU zeigt Homologien zur UDP-Glukoseepimerase aus *B. subtilis*, damit könnte des Genprodukt mit der Katalyse von alternativen C-Quelle zusammenhängen. Die genetische Umgebung der Phytase aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 scheint homolog zu der von *B. subtilis* zu sein (siehe Anhang). Im Rahmen der Genomsequenzierung von *B. amyloliquefaciens* FZB42, einem engen Verwandten von FZB45 (Idriss et al., 2002), wurde festgestellt, dass 60 % bis 70 % der Gene kollinear mit *B. subtilis* sind (Koumoutsis et al., 2004). Der ORF des *phyC*-Gens aus *B. subtilis* ist mit 1146 bp um eine Aminosäure kürzer, als der aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 (1149 bp lang). Die Homologie der Nukleinsäuresequenzen der Phytasen beträgt trotzdem 71 %, die der

Aminosäuren ebenfalls 71 %, einschließlich der ähnlichen Aminosäuren sogar 82 % (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, siehe auch Abbildung 7.8 und Abbildung 7.9). Am stärksten unterscheiden sich die ‚upstream‘-Bereiche voneinander. Interessanterweise konnte keine Phytaseaktivität bislang in *B. subtilis* 168 nachgewiesen werden. Auch in Experimenten, in denen der *phyC*-Promotor aus 168 mit *lacZ* fusioniert wurde, konnten unter keinen Bedingungen nennenswerte Promotoraktivitäten festgestellt werden (Diplomarbeit, 2001). Das *phyC*-Gen in *B. subtilis* 168 scheint kryptisch zu sein. Im Gegensatz zur *B. subtilis* 168, zeigt *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit ca. 0,2 U/ml (Medium) durchaus messbare Phytaseaktivitäten. Aus einem Sequenzvergleich der *phyC*-Gene mit anderen *Bacillus*-Vertretern ist deutlich zu erkennen, dass sich der Promotor aus *B. subtilis* 168 stark von den anderen unterscheidet (Anhang, 7.2.1). Die Entscheidung *B. subtilis* als Wirt für die Untersuchungen des Phytasepromotors aus *B. amyloliquefaciens* zu nutzen, war trotzdem berechtigt. Zum einen sind diese Stämme eng verwandt und es ist davon auszugehen, dass sich so wichtige Proteine, wie globale Regulatoren kaum voneinander unterscheiden. Zum anderen waren für die Untersuchungen keine Mutanten von FZB45 vorhanden und da er nicht gut transformierbar ist, auch nicht einfach herzustellen. *B. subtilis* 168 hingegen lässt sich sehr gut manipulieren und es steht eine große Palette an Mutanten zur Verfügung.

1.3 Welche Regulatoren kommen in Frage für die *phyC*-Regulation?

Da das Phytat theoretisch, sowohl eine Kohlenstoffquelle, als auch eine Phosphatquelle für *Bacillus* sein könnte, lag die Vermutung nahe, die Expression der Phytase (*phyC*) sei an einen oder gar beide Stoffwechselwege gekoppelt. Der Phosphathaushalt der Zelle wird durch das Pho-Regulon überwacht. Fällt die Phosphatkonzentration in der Umgebung, werden die Gene des Pho-Regulons angeschaltet. Die Verwertung von Kohlenstoffen, wie Zuckern oder Carbonsäuren, wird unter anderen im Rahmen der Katabolitrepression kontrolliert. Einige der alternativen C-Quellen können aber auch ihren eigenen Abbau beeinflussen, wie z. B. Inositol. Hinzu kommt noch die Regulation durch so genannte globale Regulatoren, wie AbrB und Spo0A oder CodY. Diese kontrollieren direkt oder indirekt sehr viele (wenn nicht fast alle) Prozesse in der Zelle.

1.3.1 Inositolstoffwechsel

Wie bereits oben erwähnt, bauen β -Propeller-Phytasen das Phytat zu *myo*-Inositoltrisphosphat ab. Der weitere Abbau ist allerdings noch völlig unklar. Bekannt ist jedoch wie *myo*-Inositol abgebaut wird, das ebenfalls als häufiger Nährstoff im Boden vorkommt und als einzige C-Quelle für *Bacillus* dienen kann. Dabei wird *myo*-Inositol zuerst in die Zelle transportiert. Diese Aufgabe übernehmen zwei Transporter (codiert durch *iolT* und *iolF*) (Yoshida et al, 2002). Dann wird das *myo*-Inositol durch eine Dehydrogenase zur 2-Ketoinosose und weiter über D-2,3-Diketo-4-desoxy-epi-inositol, 2-Desoxy-5-ketoglukonat und 2-Desoxy-5-keto-6-phosphoglukonat zur Semialdehydmalonat und Dihydroxyacetonphosphat abgebaut. Das Semialdehydmalonat wird dann durch eine Dehydrogenase zu Acetyl-CoA überführt und das Dihydroxyacetonphosphat mündet im Pentosephosphatweg.

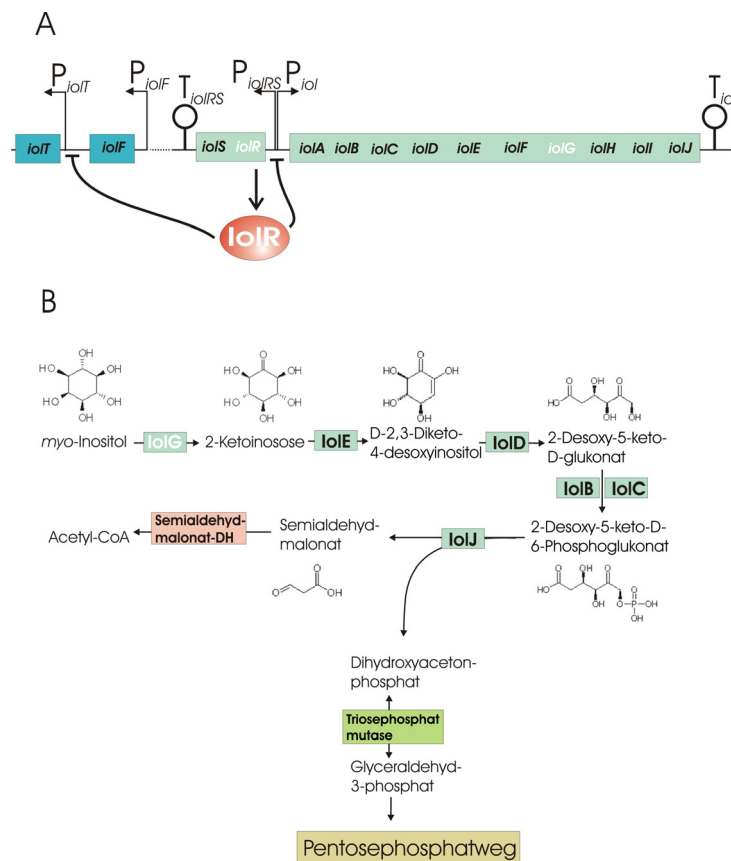


Abbildung 1.2: **Das *iol*-Divergon und der Abbau von Inositol;** (A) Das *iolABCDEFGHIJ* Operon wird von Promotor P_{iol} bis zum Terminator T_{iol} gelesen. Die Gene *iolRS* werden wahrscheinlich vom P_{iolRS} bis zum T_{iolRS} kotranskribiert. Die Gene *iolF* und *iolT* codieren für Inositoltransporter und sind monocistronisch. Mit weißer Schrift sind die Inositoldehydrogenase *iolG* (1.1.1.18) und der *iol*-Repressor *iolR* markiert deren Funktionen bereits nachgewiesen sind. (B) Die Funktionen der anderen Genprodukte wurden an Hand von Sequenzvergleichen mit bekannten Proteinen vorgeschlagen und so ein Modell des Inositolabbaus entwickelt. (nach Yoshida et al., 1997, <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00031.html>)

Die Enzyme, welche den Abbau bewerkstelligen, werden in dem Operon *iolABCDEFGHIJ* codiert. Als dazu divergentes Operon steht *iolRS*, welches für einen Repressor (IoIR) der Deo-Familie codiert. In *B. subtilis* und in *B. amyloliquefaciens* ist der IoIR-Repressor stark homolog (siehe auch Abbildung 7.11). Ein Modell der Regulation des Divergons wurde 1999 (Yoshida *et al.*, 1999) vorgeschlagen: In Abwesenheit von Inositol bindet IoIR ähnlich eines Histons an den Promotor und verhindert deren Transkription. In Anwesenheit von Inositol wird die IoIR-DNA-Bindung durch ein noch nicht identifiziertes Abbauprodukt des Inositols gelöst und das *iolABCDEFGHIJ* Operon wird abgelesen. Glukoseanwesenheit unterdrückt zusätzlich die Expression des *iol*-Operons (Katabolitrepression) (Yoshida *et al.*, 1997). IoIR hemmt außerdem den *iolT*- und den eigenen Promotor (Yoshida *et al.*, 2002). Die Funktion des IoIS-Proteins ist nicht bekannt. Es zeigt Strukturhomologie zu Aldo-Keto-Reduktasen, die eine reversible Reduktion von Carbonyl- zu Hydroxylgruppen katalysieren und oft in Verbindung mit der stressinduzierten Antwort gebracht werden.

Was geschieht aber nun zwischen dem *myo*-Inositoltrisphosphat (Abbauprodukt der *Bacillus*-Phytase) und den Inositol? Wird InsP_3 überhaupt ins Inositol überführt, wird es direkt als C-Quelle genutzt oder überhaupt nicht weiter von *Bacillus* verwendet? Eine Nichtnutzung widerspricht jeder Logik, da in der Natur potentielle Nährstoffe nicht verschwendet werden.

1.3.2 Die Katabolitrepression

Wie für die meisten Mikroorganismen, ist auch für *Bacillus* Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle. In Anwesenheit von Glukose werden deshalb Stoffwechselwege, die für den Abbau alternativer C-Quellen dienen, unterdrückt, was unter dem Begriff Katabolitrepression zu verstehen ist. Bei *E. coli* ist diese recht gut bekannt und in zahlreichen Lehrbüchern beschreiben. Glukose wird bereits während der Aufnahme in die Zelle durch das Phosphotransferase-System (PTS) phosphoryliert (Abbildung 1.3 A). Die Phosphatgruppe, die dabei übertragen wird stammt von Phosphorendolpyruvat (PEP), was dabei zu Pyruvat umgesetzt wird. Die Phosphatgruppe nimmt dann ihren Weg vom EI-Protein, über HPr bis zum EIIGlc . Hier entscheidet sich nun was mit der Phosphatgruppe geschieht. Ist Glukose vorhanden, wird die P-Gruppe über EIIB und EIIC auf Glukose übertragen, während diese in die Zelle aufgenommen wird. Ist nicht genug Glukose vorhanden, wird die P-Gruppe auf die Adenylatcyclase (AC) übertragen, die dann ATP zu cAMP umsetzt. Das cAMP verbindet sich mit dem

CAP-Protein, beide sind nun im Stande, Gene für den Abbau alternativer C-Quellen zu aktivieren (Abbildung 1.3 A).

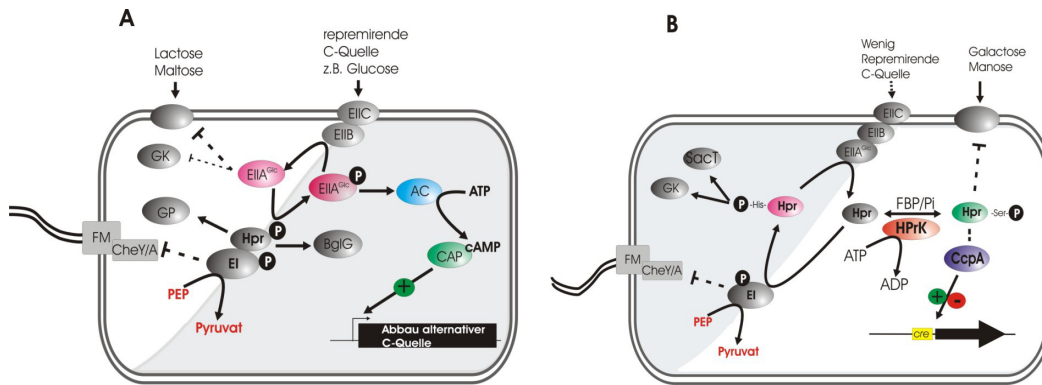


Abbildung 1.3: **Mechanismus der Katabolitrepession bei *E. coli* (A) und *Bacillus subtilis* (B).** (A) In *E. coli* ist aktiviert cAMP das CAP, das seinerseits nun als ein Aktivator von Genen für den Abbau alternativer C-Quellen fungiert. Bei Glukoseanwesenheit wird kein cAMP gebildet und so bleibt das CAP inaktiv, damit handelt es sich hier um eine 'Inducerexclusion'. (B) bei *B. subtilis* wird bei Glukoseanwesenheit CcpA durch Hpr~P(Ser) (oder Crh~P(Ser)) aktiviert und hemmt dann Gene des alternativen C-Stoffwechsels und aktiviert Genen der Glykolyse.

Bacillus subtilis verfügt nicht über cAMP. Hier ist das Protein CcpA für die globale Kontrolle des Kohlenstoffmetabolismus zuständig. In Gegenwart von Glukose bindet CcpA an die zu regulierenden Operone und reprimiert oder aktiviert die Expression der Gene. Die Katabolitrepession ist dennoch an das PTS gekoppelt, aber das zentrale Protein hier ist nicht EIIA, sondern das HPr. Das paraloge Protein Crh besitzt die gleiche Funktion wie HPr, ist aber kein Bestandteil des PTS (Deutscher *et al.*, 1995, Galinier *et al.*, 1997, Stülke und Hillen, 2000). Beide Proteine werden durch die HPr-Kinase am Ser-Rest phosphoryliert und können dann an CcpA binden (Abbildung 1.3 B). HPr~P(Ser) und Crh~P(Ser) sind positive Effektoren für das CcpA-Protein, das nun als Repressor der Gene für den Abbau alternativer C-Quellen, aber auch für Gene des Tricarbonsäure-Cyclus dient. Insgesamt werden ca. 200 Gene durch CcpA reprimiert (Yoshida *et al.*, 2001, Moreno *et al.*, 2001). Zu den Genen, die durch CcpA aktiviert werden, gehören Gene des Glukosestoffwechsels, wie der Glykolyse, und Gene für die Biosynthesen verschiedener Aminosäuren (Moreno *et al.* 2001, Blencke *et al.*, 2003). Die Erkennungssequenz von CcpA wird als cre (catabolite responsive element) bezeichnet und wurde mit dem Konsensus WWTGNAARCGNWWCAWW (-1 bis +17) beschrieben (Miwa *et al.*, 2000).

1.3.3 Die Phosphatmangelantwort

Unter Phosphatmangel (Konzentrationen unter 0,1 mM) wird in *B. subtilis* die Pho-Antwort induziert (Qi et al., 1997). Das Ziel ist die Mobilisierung von Phosphaten aus organischen Verbindungen. Unter anderen wird die Synthese der phosphathaltigen Teichonsäure eingestellt. Stattdessen werden Teichuronsäure und andere phosphatfreie Polymere produziert (Liu und Hulett, 1998), sowie verschiedene alkalische Phosphatasen, Phosphordiesterasen und andere hydrolytische Enzyme sekretiert. Das freigesetzte anorganische Phosphat wird sehr effizient durch das hochaffine Phosphat-Transport-System in die Zelle gebracht (Qi et al., 1997). In diese Prozesse ist das Pho-Regulon involviert. Die Genprodukte von *phoP* und *phoR*, PhoP und PhoR, spielen dabei die Schlüsselrolle. Sie gehören zum Zwei-Komponenten-System, welches als erstes in der Signaltransduktionskaskade angeschaltet wird (Abbildung 1.4). PhoP ist der DNA-bindende Responseregulator (RR), PhoR die Histidinkinase (HK). Unter Phosphatmangel kommt es zur Autophosphorylierung des membrangebundenen PhoR, das wiederum überträgt die Phosphatgruppe an PhoP. In dieser Form kann PhoP~P an eine Vielzahl von Promotoren binden und diese hemmen oder aktivieren. Die Bindungsstelle weist eine TTAACA-ähnliche Sequenz auf, wobei häufig zwei Paar solcher Sequenzen für die effiziente PhoP-Bindung vorhanden sein müssen. Diese werden als PhoP-Boxen bezeichnet (Liu und Hulett, 1998). Je nachdem, ob ein Promotor reprimiert oder aktiviert wird, unterscheiden sich die Bindungsstellen in ihrer Position und Anzahl.

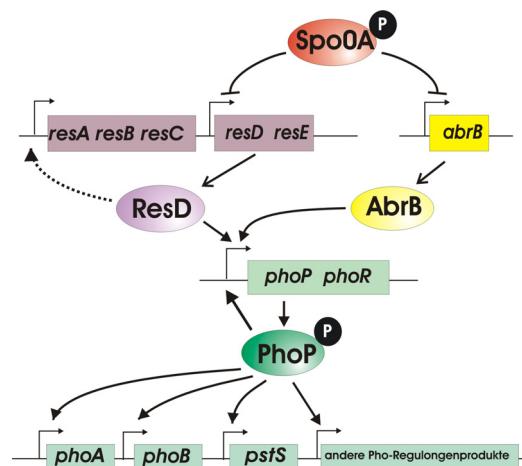


Abbildung 1.4: **Durch Phosphatmangel induzierte Signalkaskade;** Proteine sind als Ovale, Gene als Rechtecke mit Promotor (⌞) dargestellt. Mit durchgehenden Linien sind die nachgewiesenen direkten Auswirkungen auf die Expression dargestellt. Die unterbrochenen Linien stellen Interaktionen dar, die möglicherweise über Zwischenschritte ablaufen. Positive Regulation ist mit →, negative mit ⊥ angezeigt. (Abb. nach Hulett, 1996)

Das *pho*-Operon wird durch PhoP~P selbst stimuliert und durch SpoOA~P indirekt gehemmt, indem es die Expression zweier Aktivatoren, ResD und AbrB unterdrückt. Diese beiden Aktivatoren erhöhen jeweils die *phoPR*-Expression. Mutanten in *resD* verlieren 80 % und Mutanten in *abrB* 20 % der *phoPR*-Expression. Doppelmutanten in *resD* und *abrB* sind nicht in der Lage auf Phosphatmangel zu reagieren.

1.3.4 Das regulatorische Netzwerk der transienten Phase bei *B. subtilis*

Sowohl *B. subtilis* als auch *B. amyloliquefaciens* sind bodenlebende Gram-positive Bakterien. In ihrem natürlichen Habitat sind sie sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt, wie Temperaturschwankungen, Nährstoffangebot und Sauerstoffverfügbarkeit, aber auch Humidität, osmotischer Druck und pH-Wert des Bodens. Solche Wachstumsbedingungen, wie sie im Labor in einer Bakterienkultur simuliert werden, sind in der Natur utopisch, weshalb die Generationszeit von *Bacillus* im Boden 50 bis 100 Stunden beträgt und nicht wie im Labor nur 20 bis 30 min (Hecker und Völker, 1990). Deshalb hat *Bacillus* eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt um auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Dazu gehört die Synthese von degradativen Enzymen, um Makromoleküle als Nährstoffe verfügbar zu machen. Durch Antibiotikaproduktion können Konkurrenten unschädlich gemacht werden. Sind die Nährstoffe aufgebraucht und die Bedingungen lebensbedrohlich, kann *Bacillus* auf Chemotaxis umschalten und so den Standort wechseln. Als Alternative entwickelt *Bacillus* eine natürliche Kompetenz, um frei DNA aufzunehmen und sie ins eigene Genom zu rekombinieren, was einen Überlebensvorteil bringen kann. Wenn alle anderen Möglichkeiten ausgeschöpft sind, ist die Sporulation die letzte Antwort auf Stress. Ist dieser Weg einmal eingeschlagen kann er nicht mehr unterbrochen werden. Dabei entsteht eine hitze- und stressresistente Überdauerungsform (Spore), die sogar Jahrhunderte überleben kann. (Review von Msadek, 1999).

Ein komplexes und hochsensitives regulatorisches Netzwerk bewerkstelligt die Aufgaben, die Umweltbedingungen wahrzunehmen und schnell und gezielt darauf zu reagieren. Eine Schlüsselrolle hierbei spielen die Zwei-Komponentensysteme. Sie bestehen im einfachsten Fall aus einer Histidinkinase (HK), die Umweltsignale wahrnimmt und nach einer Autophosphorylierung den entsprechenden Responseregulator (RR) phosphoryliert. Dieser wiederum bindet an das Targetgen um es zu aktivieren bzw. zu reprimieren, je nach Spezifität. Die Zwei-Komponentensysteme sind unter allen Bakterien zu finden und wurden auch in

Eukaryoten nachgewiesen. Eine weitere Gruppe von Mitspielern bilden die globalen Regulatoren. Es sind meist kleinere Proteine die zwischen den einzelnen Systemen schalten können, in dem sie z. B. die Expression von Zwei-Komponentensystemen regulieren. Responseregulatoren können selbst auch global interagieren. In Prokaryoten wird außerdem die Expression durch alternative Sigmafaktoren kontrolliert. So werden während der logarithmischen Wachstumsphase vor allem σ^A - und σ^H -abhängige Gene abgelesen. Je nach Umweltbedingung verändert sich das Spektrum an Sigmafaktoren in der transienten und stationären Phase. Bei Stresseinwirkungen, wie hohem Salzgehalt oder niedrigem pH-Wert und Hitze, werden z. B. σ^B -abhängige Gene transkribiert (Hecker und Völker, 1998). Die Gene für die Chemotaxis sind σ^D -abhängig (Mirel et al., 2000). Insgesamt kennt man 18 σ^{70} -verwandte Sigmafaktoren bei *Bacillus*. *Streptomyces coelicolor*, ebenfalls ein Gram positiver Sporenbildner besitzt sogar 63 (*E. coli* hat nur 6!) (Review von Gruber und Gross, 2003). Viele von diesen, wie z. B. σ^B werden durch s. g. Antisigmafaktoren kontrolliert, die den jeweiligen Sigmafaktor binden und so der RNA-Polymerase entziehen (Review von Hughes und Mathee, 1998).

Der Masterregulator Spo0A

In *B. subtilis* kontrolliert Spo0A, ein DNA-bindendes Protein, den Übergang der Zelle in die Sporulation. Über 500 Gene wurden ermittelt, die durch Spo0A während der Sporulationsinitiation beeinflusst werden. In Studien mit der ChiP (chromatin immunoprecipitation)-on-chip-Analyse wurden 121 Gene identifiziert, an die Spo0A bindet. Darunter befanden sich 30 einzelne Gene und 24 Operons, davon wurden 40 Gene positiv und 81 negativ reguliert (Molle et al., 2003). Zu dem Spo0A-Regulon gehören unter anderem Gene für metabolische Enzyme und Effluxpumpen, Gene der Replikationsmaschinerie und Chemotaxis, aber auch Gene, die für andere Regulatoren kodieren (Molle et al., 2003). So wirkt Spo0A auf eine Vielzahl von Genen indirekt durch die Kontrolle verschiedener Transkriptionsregulatoren, wie z.B. AbrB und SinI (Strauch et al., 1990, Gaur et al., 1988).

Durch die Phosphorylierung des Masterregulators Spo0A in der vegetativen Zelle, wird die Initiation der Sporulation eingeleitet. Diese Aufgabe übernehmen fünf Histidinautokinasen (KinA, KinB, KinC, KinD und KinE) und zwei weitere Proteine (Spo0F und Spo0B) (Jiang et al., 2000). Dabei übertragen die Kinasen Phosphatgruppen auf das Spo0F. Spo0F~P seinerseits überträgt diese Phosphatgruppe

auf Spo0B, welches wiederum Spo0A zu Spo0A~P phosphoryliert (Burbulys *et al.*, 1991). Die Menge an Spo0A~P in der Zelle hängt ebenfalls von der Aktivität bestimmter Phosphatasen ab, wie RapA und Spo0E (Grossman, 1995), welche die Phosphatgruppen von Spo0F~P und Spo0A~P wieder abspalten (Abbildung 1.5).

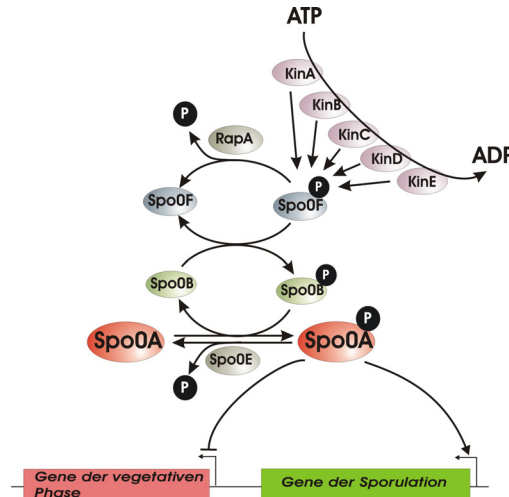


Abbildung 1.5: **Die Aktivierung von Spo0A**; Die Phosphatgruppe wird von ATP über mehrere Histidinkinasen (KinA, KinB, KinC, KinD und KinE) über Spo0F und Spo0B auf Spo0A übertragen. So aktiviertes Spo0A~P stimuliert die Expression von Sporulationsgenen und hemmt gleichzeitig die Gene des vegetativen Wachstums (⌞ = Promotoren). Die Phosphatgruppen können durch Phosphatasen wieder entfernt werden, dabei dephosphoryliert RapA das Spo0F~P und Spo0E das Spo0A~P.

Das aktivierte Spo0A~P bindet an sogenannte „OA“-Boxen mit der Konsensussequenz 5´-TGTCGAA-3´ (Strauch *et al.*, 1990, Baldus *et al.*, 1994) und vermittelt so den Kontakt zwischen der σ^A - (bzw. σ^H -) assoziierten RNA-Polymerase und der DNA. Spo0A fungiert als Repressor für vegetative Gene und als Aktivator für Gene der frühen Sporulationsphase (z.B. *spoII*E- und *sigF*-Gene, das *spoII*G- und *spoII*A-Operon; Review von Piggot und Losick, 2002). Spo0A-orthologe Proteine wurden in allen bis jetzt sequenzierten Endsporenbildnern, des Genus *Bacillus* gefunden.

Der globale Regulator AbrB

Das AbrB Protein aus *Bacillus subtilis* reguliert die Expression von über 100 Genen, die für die Adaptation der Zelle auf Nährstoffmangel sorgen. AbrB spielt eine zentrale Rolle als Regulator bei der Produktion von Antibiotika (Marahiel *et al.*, 1993, Philips und Strauch, 2002), bei der Bildung von Biofilmen und Fruchtkörpern (Branda *et al.*, 2001, Hamon *et al.*, 2004), der Ausbildung von Kompetenz (Hahn *et al.*, 1995), der Sporulation (Perego und Hoch, 1991, Zuber und Losick, 1987), der Bildung von Proteasen und degradativen Enzymen (Philips und Strauch, 2002) und bei vielen

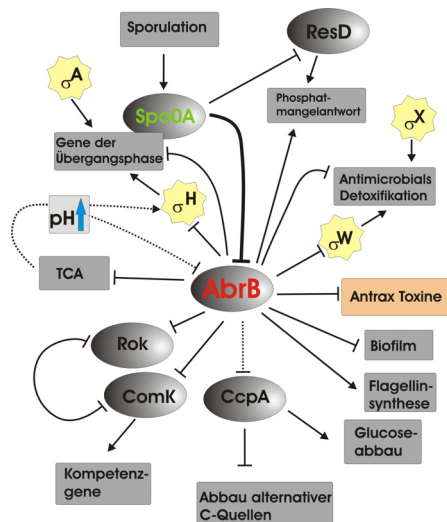


Abbildung 1.6: Einfluss von AbrB auf die Prozesse in der Zelle während der transienten und stationären Wachstumsphase; In den meisten Fällen ist AbrB ein Transkriptionsrepressor (wie für SigmaH, SigmaW oder ComK), eine Aktivatorfunktion konnte nur für die Phosphatmangelantwort (PhoPR-Operon, Sun *et al.*, 1996) und die Flagelinsynthesegene (Mirel *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Positive Regulation ist mit \rightarrow , negative mit \perp gekennzeichnet, gestrichelte Linien stellen indirekten Einfluss dar.

Das Protein bindet als ein Homotetramer an Promotoren mit niedriger Affinität und als Homotetramer oder Homodimer an Promotoren mit hoher Affinität (Vaughn et al., 2001). Die DNA-Bindedomäne ist N-terminal lokalisiert und zeigt hohe Homologie mit zwei weiteren *Bacillus*-Proteinen: Abh und SpoVT (Benson et al., 2002, Vaughn et al. 2001, Bobay et al., 2005). Die Proteinstruktur weist keinerlei Ähnlichkeiten zu anderen bekannten DNA-Bindeproteinen auf und stellt eine neue Klasse der DNA-Bindemotive dar: ‚Looped-hinge Helix‘. Orthologe und paraloge Proteine findet man in allen sequenzierten Bacillen, Clostridien und Listerien. Sequenzvergleiche mittels Blast weisen Homologien bei weiteren Vertretern, wie *Oceanobacillus*, *Geobacillus*, *Ruminococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Moorella*, *Desulfitobacterium* und *Exiguobacterium*, auf. Es wurden über 40 verschiedene Erkennungsmotive für AbrB gefunden, aber ein Konsensus lässt sich nicht ableiten. Allerdings konnte kein bevorzugtes Sequenzmotiv gefunden werden (Xu et al., 1996, Xu und Strauch, 1996, Vaughn et al., 2000 und 2001), woraus sich ableiten lässt, dass AbrB eher dreidimensionale DNA Strukturen erkennt, als spezielle Sequenzmotive.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit, sollten die Mechanismen der *phyC*-Regulation untersucht sowie die daran beteiligten Regulatoren und deren Bindungsstellen in Promotor gefunden werden.

Dazu wurde der *phyC*-Promotor aus *Bacillus amyloliquefaciens* FTB45 in dem pDG268-Plasmid mit dem Reportergen *lacZ* (aus *E. coli*) fusioniert. Reporteraktivitäten sollten anschließend unter verschiedenen Einflüssen in dem Wirt *Bacillus subtilis* 168 untersucht werden. Den ersten Einblick in die Verknüpfungen an bestimmte Stoffwechselwege, sollten die Expressionsversuche in unterschiedlichen Medien und unter verschiedenen äußeren Einflüssen bieten. Das sollte die Wahl der Regulatormutanten erleichtern, in denen die weiteren Untersuchungen vorgenommen werden sollten. Für die Expressionsversuche musste erst ein Grundmedium ermittelt werden, in dem das *phyC* exprimiert wird, gemessen an der Aktivität des Reporters (β -Galaktosidase).

Nach nähere Charakterisierung der beteiligten Regulatoren, sollten die Bindungsstellen in dem *phyC*-Promotor ausfindig gemacht und die durch diese vermittelten Mechanismen der Regulation aufgeklärt werden.. Für die Analyse der Bindungsstellen wurden die Promotorverkürzungen sowie die Basensubstitutionen und Deletionen im Promotor angewandt. Weitere Untersuchungen, für die auch die entsprechenden Proteine kloniert und gereinigt werden mussten, wurden mittels der Gelretardationsanalyse, der DNaseI-Footprinttechnik sowie der in vitro Transkription vorgenommen.

2 Ergebnisse

2.1 Expressionsversuche

Ein 495 Basenpaar *phyC*-Promotorfragment aus *B. amyloliquefaciens* FZB45, dass die Region von -287 bis +208 umfasst, wurde mit *lacZ* fusioniert und in *Bacillus subtilis* 168 gebracht. Die *phyC*-Expression konnte so an Hand der β -Galaktosidase (Reporter) untersucht werden. Da in den Versuchen auch der Einfluss von Phosphat auf die Expression untersucht wurde, war die Verwendung eines Reporters notwendig, denn die Bestimmung der extrazellulären Phytaseaktivität beruht auf dem Nachweis von freien Phosphaten. Mit dieser *phyC-lacZ*-Fusion wurden der Einfluss verschiedener Mediumbedingungen sowie unterschiedlicher Mutationen in bestimmten Regulatoren auf die *phyC*-Expression untersucht.

2.1.1 Expression von *phyC* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Um erste Erkenntnisse über mögliche Einflüsse auf die Phytaseexpression zu erlangen, wurden zuerst verschiedene Wachstumsbedingungen getestet. Dabei wurden der Einfluss der Phosphatkonzentration und der Anwesenheit von Glukose als katabolitreprimierende C-Quelle, sowie die *phyC*-Expression nach Stressinduktion und in Anwesenheit von Inositol oder Phytat untersucht.

***Bacillus subtilis* als Wirt für die Untersuchungen der *phyC*-Expression**

Da die Experimente in einem heterologen System durchgeführt wurden, war es wichtig zu überprüfen, ob der *phyC*-Promotor aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 im *B. subtilis* Stamm OM61 exprimiert wird und wie das Expressionsverhalten ist. Der korrespondierende *phyC*-Promotorbereich (-393 bis +180) aus *B. subtilis* 168 wurde ebenfalls im Stamm OM21 auf seine Reporteraktivität untersucht. Als Kontrollstamm wurde der Stamm OMK mitgeführt, dieser enthielt nur das Ausgangsplasmid pDG268 und diente als Kontrolle für die Hintergrundaktivität der endogenen β -Galaktosidase (Errington und Vogt, 1990).

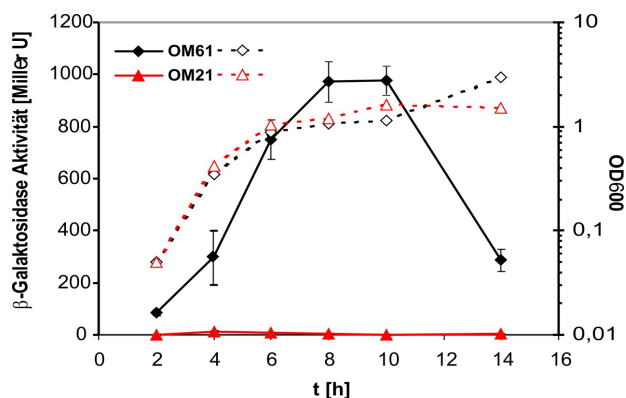


Abbildung 2.1: **Wachstumsabhängige Expression des Reportergens** (β -Galaktosidase) unter der Kontrolle des Phytasepromotors aus *B. subtilis* 168 (OM21) und *B. amyloliquefaciens* FZB45 (OM61). β -Galaktosidase Aktivität wurde mit durchgehenden Linien und geschlossenen Symbolen und die optische Dichte mit gestrichelten Linien und offenen Symbolen dargestellt. Da der Kontrollstamm OMK bei den beschriebenen Experimenten keine β -Galaktosidase aufwies, wurde auf eine graphische Darstellung dieser Mutante verzichtet.

Wie der Abbildung 2.1 zu entnehmen ist, zeigten nur die Mutanten mit dem *phyC*-Promotor aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 (OM61) β -Galaktosidase Aktivität. Diese stieg mit zunehmender Zellzahl und erreicht ihr Maximum in der stationären Phase. Wobei die Expression des Reportergens am stärksten während der transienten Phase, (zwischen der vierten und sechsten Stunde nach Umsetzen der Kultur ins LPM) zunahm. Nach 14 stündiger Inkubation fiel die Reporteraktivität auf ca. 30 % der maximalen Aktivität (8 Stunden). Im Gegensatz dazu, zeigten die OM21-Mutanten keine Reporteraktivitäten, was bestätigt, dass der *phyC*-Promotor aus *B. subtilis* 168 nicht funktionell ist. Da die Kontrollmutante OMK (ohne Promotor) ebenfalls keine β -Galaktosidase Aktivität zeigte, konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Hintergrundaktivität ausgeschlossen werden (hier nicht dargestellt). Damit wurde sichergestellt, dass *B. subtilis* ein geeignetes Expressionssystem für die Untersuchungen der *phyC-lacZ*-Expression bietet.

Die *phyC*-Expression in Abhängigkeit vom Phosphatangebot

Die Untersuchungen der Abhängigkeit der *phyC*-Expression vom Phosphatangebot wurden in Medien mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen (0,38 mM = LPM, 0,5 mM, 0,75 mM und 1mM) vorgenommen. Da während des Wachstums der Phosphatgehalt in den Kulturen sehr schnell abnahm, mussten jede Stunde die Phosphatkonzentrationen bestimmt und auf die entsprechenden Werte wieder titriert (durch Zugabe vom K-Phosphatpuffer) werden. Die niedrigste Phosphatkonzentration (0,38 mM Ausgangskonzentration im LPM) wurde nicht titriert,

hier war nach 4 Stunden fast kein freies Phosphat mehr nachweisbar (unter 0,05 mM).

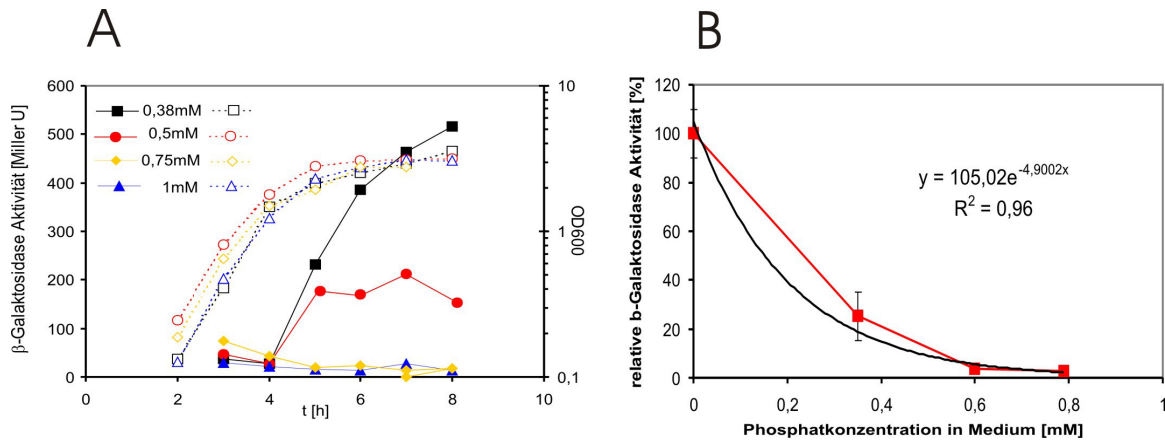


Abbildung 2.2: Einfluss der Phosphatkonzentration auf die *phyC-lacZ*-Expression; (A) Wachstum und β -Galaktosidase Aktivität in Medien mit unterschiedlichem Phosphatangebot (mM). Durchgehende Linien und geschlossene Symbole = Reporteraktivität, gestrichelte Linien und offene Symbole = OD600; (B) Darstellung der Reporteraktivität nach 8 Stunden in Abhängigkeit von der tatsächlich gemessenen Phosphatkonzentration des Mediums, als 100 Prozent wurde die Aktivität nach 8 Stunden im LPM (Ausgangskonzentration 0,38 mM) gesetzt. Durch die Titration schwankten die Phosphatkonzentrationen während des Wachstums, dies hat zu Schwankungen in den β -Galaktosidasewerten und hohen Standardabweichungen geführt, deshalb wurden nur die Werte aus einer Messung dargestellt und die Standardabweichungen nicht eingefügt, auch wenn das Experiment zwei mal unabhängig voneinander durchgeführt wurde

Aus diesem Experiment wurde deutlich, dass die *phyC*-Expression stark abhängig von dem Phosphatgehalt des Mediums war (Abbildung 2.2 A). Je niedriger die Phosphatkonzentration, desto stärker war die Reporteraktivität, wobei die Aktivität ein negatives exponentielles Verhalten aufwies (Abbildung 2.2 B). Im LPM (Phosphatgehalt < 0,38 mM) war die Reporteraktivität fast 100 mal höher als in dem Medium mit 1 mM Phosphat. Dies ließ auf eine Kopplung an die Phosphatmangelantwort schließen, weshalb in den folgenden Versuchen die Bestimmung der APase-Aktivität parallel durchgeführt wurde. Die APasen (Alkalische Phosphatasen) PhoB und PhoA, kodiert durch *phoB* und *phoA*, gehören zum Pho-Regulon (Liu und Hulett, 1997 und Liu *et al.*, 1998) und machen den Hauptanteil (ca. 98 %) an APasen in *B. subtilis* aus. Sie werden hauptsächlich bei Phosphatmangel exprimiert (Brookstein *et al.*, 1990, Kapp *et al.*, 1990) und oft als Indikator für die PhoP-aktivierte Phosphatmangelantwort eingesetzt. Bei Expressionsversuchen in LPM konnte dabei ein 1:1-Verhältnis der Aktivitäten beider Enzyme (β -Galaktosidase/APase) beobachtet werden (Anhang, Abbildung 7.1), wobei die β -Galaktosidase während der transienten Phase ca. 1,5-fach stärker exprimiert wurde als die Vergleichsaktivität der APasen. Dies könnte ein

Hinweis auf zusätzliche regulatorische Faktoren sein, die bei *phyC* aktiv sind aber keinen Einfluss auf die APase-Aktivität oder gar auf das PhoP-System haben.

Um zu zeigen, dass dieses Resultat auch auf das ursprüngliche System in *B. amyloliquefaciens* FZB45 übertragbar ist, wurde gesamt-RNA von FZB45 aus LPM- und HPM-Kulturen für eine RT-PCR eingesetzt. Die RT-Reaktionen wurden mit je 5 µg gesamt-RNA und dem Om09 Primer und die anschließende PCR mit 5 µl der RT-Ansätze mit den Primern Om09 und Om10 durchgeführt. Hier war ebenfalls nur ein amplifiziertes DNA-Fragment von 205 bp Größe bei Verwendung der RNA aus der LPM-Kultur nachweisbar. Es wurde kein Amplifikat unter Verwendung der RNA aus der HPM-Kultur gewonnen (Abbildung 2.3). Die Bandenstärke des Amplifikates nahm von 4 Stunden nach 8 Stunden stark zu. Dieses Verhalten konnte auch bei der Reporteraktivität im *B. subtilis*-Modell beobachtet werden, wo die Expression während der transienten Phase stark zunahm. Man kann somit davon ausgehen, dass sich der *phyC*-Promotor aus FZB45 in *B. subtilis* ähnlich verhielt wie in *B. amyloliquefaciens*.

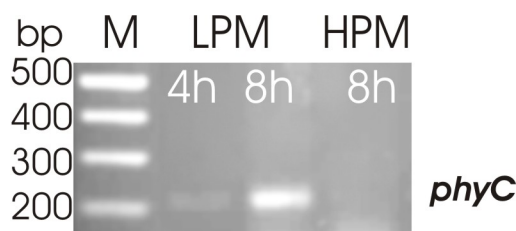


Abbildung 2.3: RT-PCR-Nachweis der *phyC*-Expression in LPM und HPM bei *B. amyloliquefaciens* FZB45; Ein PCR-Produkt nach der RT-Reaktion konnte nur für die LPM-Kultur nachgewiesen werden.

Einfluss der C-Quelle auf die *phyC*-Expression

Während des Wachstums auf Glukose wird die Expression vieler Gene im Rahmen der Katabolitrepression unterdrückt. Wachsen die Zellen auf einer alternativen C-Quelle (wie Inositol) kommt es nicht zur Katabolitrepression, sondern zur Stimulation der Gene, welche für die Nutzung der jeweiligen C-Quelle benötigt werden. Die Induktion erfolgt meist durch die C-Quelle selbst oder deren Abbauprodukte. Phytat, als Substrat der Phytase, stellt eine alternative C-Quelle dar. Da das C-Grundgerüst ein Inositolring ist, könnten dessen Abbauprodukte im Inositolstoffwechsel münden. Um den Einfluss von Glukose, Inositol und Phytat als C-Quellen zu untersuchen, wurden die OM61-Mutanten in Medien mit diesen C-Quellen angezogen. Dabei wurde LPM als Grundmedium (0,5 % Glukose) verwendet und die Glukose durch die anderen Kohlenstoffquellen ersetzt (Inositol oder Phytat) bzw. auf 5 % erhöht.

Die Kulturen wuchsen ungefähr gleich gut. Wurden die 0,5 % Glukose durch 0,5 % Inositol ausgetauscht, hatte dies keinen Einfluss auf die APase- Aktivität. Die β -Galaktosidase Aktivität war um 35 % niedriger im LPM+Inositol gewesen, zeigte aber einen ähnlichen Verlauf wie im LPM. Inositol scheint damit eher einen negativen Einfluss auf die *phyC* Expression auszuüben.

Im LPM+Phytat waren erst nach 6 Stunden Wachstum β -Galaktosidase und APase- Aktivitäten überhaupt messbar. Dies ließ sich darauf zurückführen, dass das handelsübliche Phytat stark mit freien Phosphaten (bis zu 30 %, nach Sigma) verunreinigt ist und es so zu einem Eintrag von Phosphat ins LPM gekommen war. Die Phosphatkonzentration des Mediums am t_0 wurde mit 0,62 mM bestimmt. Deshalb konnte man erst Aktivitäten der beiden Enzyme messen, nachdem das Phosphat verbraucht war. Da sich hier der Phosphateffekt so stark ausgeprägt hat, ließ sich keine Aussage darüber treffen, ob Phytat oder deren Abbauprodukte einen Effekt auf die *phyC*-Expression haben.

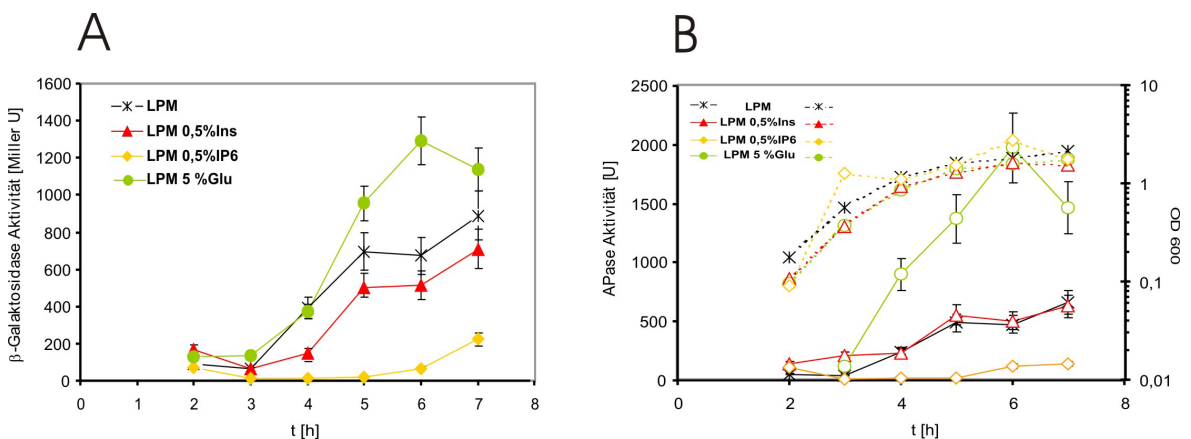


Abbildung 2.4: Einfluss der Kohlestoffquelle auf die *phyC-lacZ*-Expression; (A) β -Galaktosidase Aktivitäten in Medien mit unterschiedlichen C-Quellen, sowie (B) der Wachstumsverlauf (OD600, gestrichelte Linien) und die APase- Aktivitäten (durchgehende Linien); LPM (Low Phosphate Medium mit 0,5 % Glukose), in den restlichen Medien wurden die 0,5 % Glukose, wie in der Graphik aufgeführt ersetzt durch: Ins = Inositol, IP6 = Phytat, Glu =Glukose.

Ein überraschendes Ergebnis ergaben die Kulturen im LPM mit 5 % Glukose. Hier sollte eine Katabolitrepression durch den hohen Glukosegehalt erzielt werden. Beide Enzyme zeigten jedoch stark erhöhte Aktivitäten. Die APase zeigte sogar noch höhere Aktivitäten (bis 2000 U) als β -Galaktosidase (bis 1300 MU). Damit kann eine Katabolitrepression auf *phyC* und auf die APasen ausgeschlossen werden. Der Glukoseeinfluss könnte auf eine direkte, induzierende Wirkung von CcpA sowohl auf *phyC*, als auch *phoA* und/oder *phoB* zurückzuführen sein, oder auf einen anderen, reprimierenden Regulator, welcher der Katabolitrepression unterliegt. Da das

Wachstum in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen sogar etwas schwächer war, als in der LPM-Kontrollkultur, kann ein Effekt des Wachstums auf die erhöhten Aktivitäten ausgeschlossen werden.

Die *phyC*-Expression nach Stressinduktion

Phosphatmangel induziert nicht nur das Pho-Regulon, sondern auch das σ^B -Regulon. Da die *phyC*-Expression in den vorhergehenden Experimenten durch Phosphatmangel induziert werden konnte, war es wichtig zu prüfen, ob dies mit der Stressantwort in Verbindung steht. Während der allgemeinen Stressantwort werden über 200 Gene angeschaltet (Peterson *et al.*, 2001, Price *et al.*, 2001). Die σ^B -vermittelte Stressantwort wird durch Zugabe von Ethanol oder bei hohem Salzgehalt und niedrigen pH-Werten des Mediums induziert (Boylan *et al.*, 1993, Völker *et al.*, 1995). Bei diesen Versuchen wurden die OM61-Kulturen beim Erreichen der transienten Phase, verschiedenen Stresssituation ausgesetzt: 0,5 M Natriumchlorid oder 1,5 M Ethanol im Medium oder pH-Wert des Mediums 5,0.

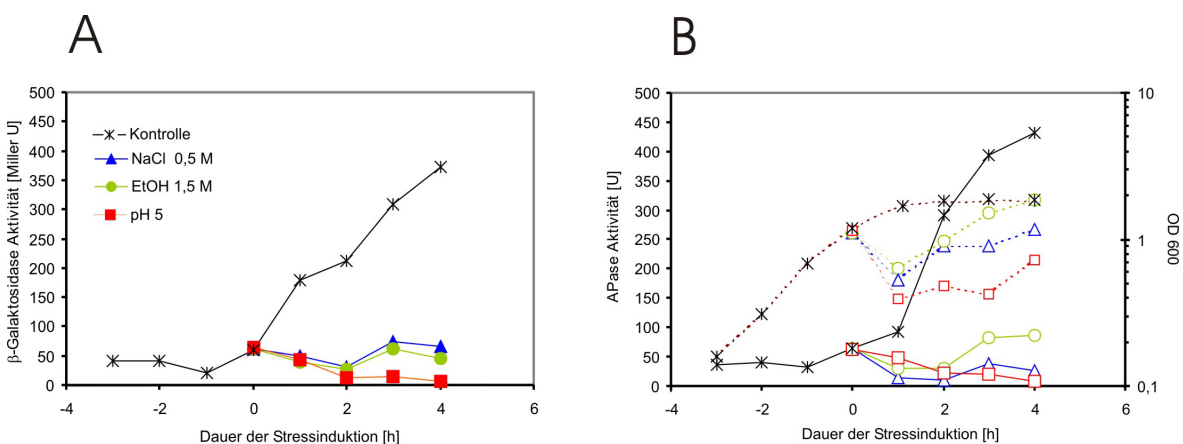


Abbildung 2.5: **Stressinduzierte *phyC-lacZ*-Expression**; (A) Aktivität des Reportergens und (B) der APase, sowie das Zellwachstum nach Induktion von verschiedenen Stresssituationen. Aus einer ÜN-Kultur wurde eine LPM-Kultur angeimpft und 4 Stunden inkubiert. Diese Zeit entsprach dem Zeitpunkt der transienten Phase (t_0). Danach wurde diese zu 8 ml Portionen pelletiert und zu gleichen Volumen in den unterschiedlichen Medien aufgenommen: LPM (Kontrolle), LPM + NaCl (0,5 M), LPM + Ethanol (1,5 M) und LPM mit pH 5. Die Kontrollkultur in LPM wurde nicht induziert.

Bis zum Zeitpunkt t_0 zeigten alle drei Kulturen vergleichbare β -Galaktosidase und APase- Aktivitäten und ähnliches Wachstum. Nach der Umsetzung in die verschiedenen Medien fiel die optische Dichte (OD) der stressinduzierten Kulturen, was nicht ungewöhnlich war, da sich die Zellen den neuen Bedingungen erst anpassen mussten. Da die Zellen in ein frisches Medium umgesetzt wurden, stieg die OD bei den

Kulturen mit NaCl und Ethanol bald wieder. Die Kultur mit niedrigem pH-Wert wuchs dagegen nur langsam wieder hoch.

Die β -Galaktosidase sowie die APase-Aktivitäten fielen in allen Stressinduzierten Kulturen, während sie sich in der Kontrollkultur, wie üblich verhielten. Das spricht dafür, dass das *phyC*-Gen nicht unter der Kontrolle des σ^B -Regulons steht, sonst wären die Reporteraktivitäten während der Stressinduktion gestiegen.

2.1.2 Abhängigkeit der *phyC*-Expression von verschiedenen Regulatoren

Um den Einfluss einiger Regulatoren auf die *phyC*-Expression zu untersuchen, wurde das *phyC-lacZ*-Fusionsprodukt in *B. subtilis* Regulationsmutanten gebracht: OM62 = *phoP*, OM64 = *spo0A13*, OM67 = *ccpA*, OM12 = *abrB*, OM13 = *abrBspo0A*. In diesen genetischen Hintergründen wurden dann die Reporteraktivitäten gemessen.

Einfluss von PhoP auf die *phyC*-Expression

Das *phoP*-Gen kodiert für den Responseregulator PhoP, der bei Phosphatmangel aktiviert wird und die Expression von Genen induziert, die den Abbau alternativer Phosphatquellen bewerkstelligen (näheres siehe 1.3.3). Da bereits der Nachweis über die Abhängigkeit der *phyC*-Expression vom Phosphatangebot erbracht werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass das *phyC*-Gen durch PhoP direkt reguliert sein könnte.

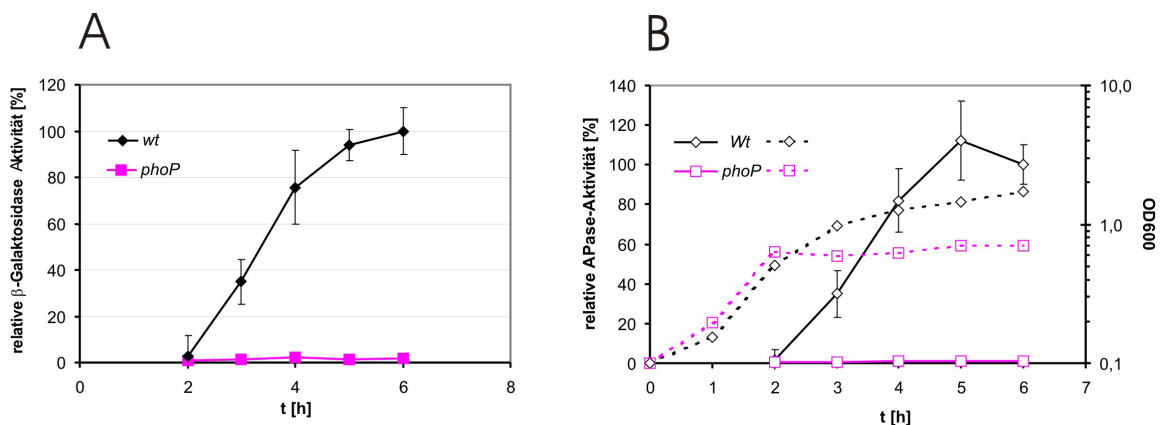


Abbildung 2.6: Einfluß der *phoP*-Mutation auf die *phyC*-Promotoraktivität; Eine *phoP* Mutation unterdrückt die Expression des Reporters (A), sowie der APase (B) vollständig. Das Wachstum (B) wird ebenfalls beeinflusst, die Kultur geht sehr früh in die stationäre Phase über. OD600 = gestrichelte Linien, Enzymaktivitäten = durchgehende Linien.

Die APasen PhoB und PhoA gehören zum Pho-Regulon (Liu und Hulett, 1997 und Liu et al., 1998), demzufolge war in dem *phoP*-Hintergrund (OM62) keine APase-Aktivität zu erwarten, was sich auch bestätigte (Abbildung 2.6 B). Es konnten auch nur

sehr geringe β -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden (unter 5 MU, Abbildung 2.6 A). Das zeigt, dass die Expression des Phytasegens ebenfalls von PhoP abhängig ist. Die OM62-Mutanten erreichten früher die stationäre Phase. Auch dies kann auf die fehlende Phosphatmangelantwort zurückgeführt werden. Die Zellen konnten keine gebundenen Phosphate mobilisieren, dadurch wechselten sie in die stationäre Phase über, sobald das freie Phosphat aufgebraucht war.

Auswirkungen der *ccpA*-Mutation auf die *phyC*-Promotoraktivität

In den Versuchen mit 5 % Glukose im Medium wurden erhöhte Reporteraktivitäten gemessen. Um festzustellen, ob dieser Effekt in Zusammenhang mit CcpA steht, wurde die *phyC*-Expression in einer *ccpA* negative Mutante untersucht. Das Genprodukt von *ccpA* (CcpA) ist ein DNA-bindendes Protein, das die Katabolitrepression in *B. subtilis* vermittelt. Zusammen mit Hpr~P(Ser) hemmt es die Expression von Genen für den Abbau alternativer C-Quellen, gleichzeitig stimuliert es auch viele Gene des Glukosestoffwechsels (genaueres siehe 1.3.2).

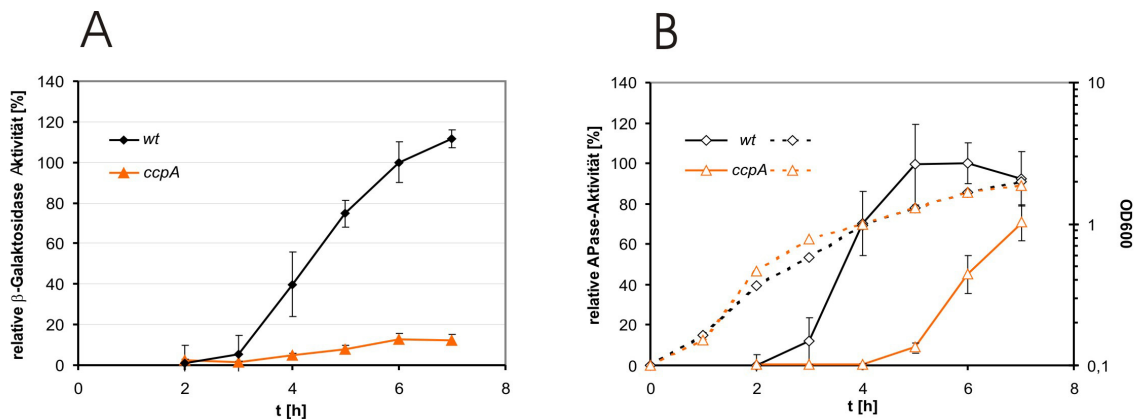


Abbildung 2.7: **Einfluß der *ccpA*- Mutation auf die *phyC*-Promotoraktivität**; Eine *ccpA*-Mutation hat einen starken negativen Effekt auf die β -Galaktosidase (A) und die APase- Aktivität (B), während das Zellwachstum (OD600, gestrichelte Linien) nicht gestört wird. Enzymaktivitäten sind mit durchgehenden Linien dargestellt.

In dem *ccpA*-negativen Hintergrund konnten nur niedrige Reporteraktivitäten gemessen werden (unter 20 %, Abbildung 2.7). Allerdings war auch die APase-Expression wesentlich beeinträchtigt, erst nach 5 Stunden Wachstum begann die Aktivität zu steigen und erreichte nach 7 Stunden 70 % der APase-Aktivität des Wildtyps. Interessanterweise wurde kürzlich eine reprimierende Wirkung von CcpA auf das *phoPR*-Operon nachgewiesen. Entsprechend war die Expression von *phoPR* in einer *ccpA*-Mutante im LPM 8 mal höher im Vergleich zum Wildtyp (Puri-Taneja et al.,

2006). Damit steht die niedrige β -Galaktosidase- und APase-Aktivität in der *ccpA*-Mutante in keinem Zusammenhang zu PhoP, sonst hätten diese auf Grund der verstärkten *phoPR*-Expression eher steigen müssen. Diese Ergebnisse passen ebenfalls recht gut zu den beobachteten erhöhten Reporter- und APase-Aktivitäten im LPM + 5% Glukose. Bei hohen Glukosekonzentrationen steigt die HPr~P(Ser)-Konzentration und das CcpA wird verstärkt aktiviert. Unter diesen Bedingungen war auch die Reporter- und APase-Expression stärker (Abbildung 2.4). In den *ccpA*-Mutanten fielen die Aktivitäten entsprechend. Daraus kann man schlussfolgern, dass CcpA entweder ein direkter oder indirekter Aktivator oder ein Repressor für einen weiteren Repressor beider Gene sein könnte. Mit Bestimmtheit kann aber eine Katabolitrepression auf *phyC* ausgeschlossen werden. Der späte Anstieg der APase-Aktivität kann möglicherweise auf eine stimulierte Expression der APasen während der Sporulationsinduktion zurück geführt werden (Chesnut *et al.*, 1991).

Vergleich der *phyC*-Expression in *spo0A*-, *abrB*- und *abrBspo0A*- Mutanten

Die beiden Proteine AbrB und Spo0A sind Antagonisten und kontrollieren den Übergang der Zelle in die stationäre Wachstumsphase. Während des exponentiellen Wachstums ist die Konzentration von AbrB hoch und die von Spo0A niedrig: Das Verhältnis kehrt sich während der transienten Phase um. Spo0A (in seiner aktiven, phosphorylierten Form) ist ein Repressor für *abrB* und AbrB ist ein indirekter Repressor für *spo0A*. Damit kommt es zu einer Überexpression von AbrB in *spo0A*- Mutanten. Die Wirkung solcher Mutanten kann durch eine *abrB*-Mutation teilweise aufgehoben werden (Strauch, 1993). Die *phyC-lacZ*-Expression wurde in *abrB*-, *spo0A*- und *abrBspo0A*- Mutanten getestet um die Wirkung beider Proteine zu analysieren.

Die APase-Aktivität verhielt sich, wie in der Literatur beschrieben. Das *phoPR*-Operon, dessen Produkt PhoP~P die APase-Expression induziert, benötigt AbrB zur vollen Expression (Guofu *et al.*, 1996, Sun *et al.*, 1996). In der *abrB*-Mutante (OM13) sank die Aktivität auf 85 % und stieg auf 112 % in der *spo0A*-Mutante (OM64). In der Doppelmutante lag die Aktivität der APase sogar bei 150%.

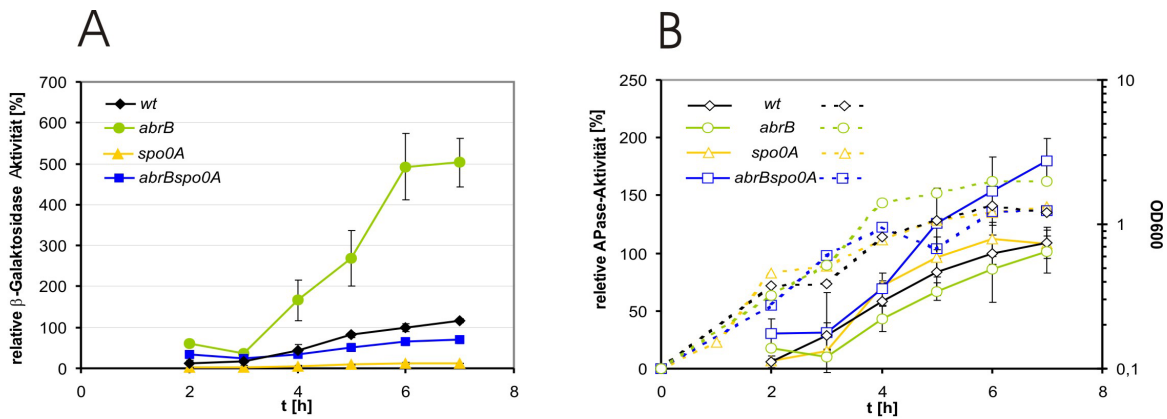


Abbildung 2.8: Einfluss der *abrB*-, *spo0A*- und *abrBspo0A*-Mutationen auf die *phyC*-Promotoraktivität; (A) Die Expression von *phyC-lacZ* war 5 mal höher in der *abrB*- Mutanten (grün) als im Wildtyp (schwarz), in der *spo0A*-Mutante (gelb) wurde die Expression unterdrückt und in der *abrBspo0A*-Doppelmutante (blau) erreichte die Promotoraktivität beinahe die Wildtyp-Aktivitäten. (B) Die APase-Aktivität (durchgehende Linien) sank nur wenig in der *abrB*- und stieg in *spo0A*-Mutanten und Doppelmutanten. Die optische Dichte wurde ebenfalls gemessen (gestrichelte Linien).

In der *abrB*-Mutante (OM13), war der *phyC*-Promotor sehr aktiv, die β -Galaktosidase Aktivität war 5 mal höher (500 %) als im Wildtyp. In der *spo0A*-Mutante (OM64) war die Reporteraktivität 10 mal niedriger (unter 10 %) als im Wildtyp (100 %). In der *spo0A*-Mutante, wo das AbrB überproduziert wird, wurde *phyC* gleichzeitig unterdrückt. In der Doppelmutante *abrBspo0A* (OM12) erreichte die Reporteraktivität wieder 75 % der ursprünglichen Wildtypaktivität. Damit unterliegt *phyC* einer direkten oder indirekten negativen Kontrolle durch AbrB. Spo0A scheidet als *phyC*-Aktivator aus, denn in der Doppelmutante würde immer noch der Aktivator fehlen und es dürften keine Aktivitäten auftreten. Fehlt aber nur der Repressor (AbrB) und sein Repressor (Spo0A), so sollte die Reporteraktivität wiederhergestellt und messbar sein, wie es hier der Fall war.

2.2 Organisation des *phyC*-Gens aus *B. amyloliquefaciens* FZB45

Das *phyC*-Gen

Ein Northern-Blot wurde angefertigt, um festzustellen, ob *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 ein monocistronisches Gen ist, oder in einer Operonstruktur organisiert ist. Leider war das Ergebniss dieses Experimentes nicht sehr zufriedenstellend, denn die hybridisierte Bande zeigte eine Größe von unter 1000 Basen (Abbildung 2.9 A). Nach längerer Entwicklung, nachdem sich bereits die

Membran zu färben begann, konnte man allerdings direkt über der *phyC*-Bande ein großen helleren Bereich erkennen (in der Abbildung oval markiert), der eine Größe von ca. 1500 Basen aufwies. Da diese Größe der 16S rRNA entspricht, lag die Vermutung nahe, dass die 16S rRNA die *phyC*-Bande nach unten verdrängte. Die rRNA macht einen enormen Anteil an der gesamt-RNA aus. Um die *phyC*-Bande sichtbar zu machen wurden für den Northern immerhin 60 µg gesamt-RNA eingesetzt, damit befand sich sehr viel rRNA in den Proben. Dadurch war die 16S rRNA-Bande entsprechend sehr stark. So lässt sich über die Größe des *phyC*-Transkriptes nur die Aussage treffen, dass es kleiner als die 16S rRNA und damit unter 1500 Basen liegt. Eine Analyse der ‚open reading frames‘ (ORFs) in der Nachbarschaft von *phyC* aus FZB42 (Koumoutsis et al., 2004) zeigte keine ORFs direkt hinter *phyC* (Abbildung 2.9 B). Deshalb kann man davon ausgehen, dass *phyC* in *B. amyloliquefaciens* ein monocistronisches Gen ist, so wie in anderen verwandten Bacillen.

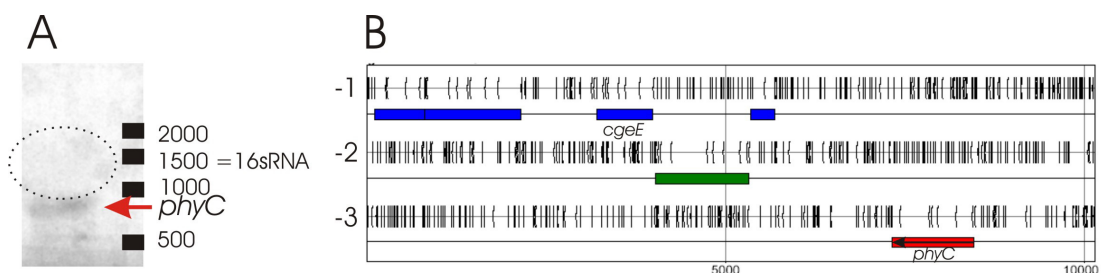


Abbildung 2.9: Northern-Blot-Analyse; (A) Die *phyC*-RNA Bande (roter Pfeil) lief nicht ihrer Größe entsprechend, da sie durch die 16s RNA (gestricheltes Oval) nach unten gedrückt wurde. (B) Analyse der Sequenz hinter *phyC* (rot) aus FZB42 zeigten keine ORFs in der direkten Nachbarschaft.

Ermittlung des Transkriptionsstarts

Um den Transkriptionsstart zu ermitteln und so die -10 Region zu bestimmen, wurde eine 5'RACE (rapid analysis of cDNA ends) und eine Primerextension angewandt. Dazu wurde die gesamt-RNA aus jeweils einer LPM und HPM-Kultur des *B. amyloliquefaciens* FZB45 nach 8 Stunden Wachstum isoliert.

Die 5'RACE wurde wie unter 5.2.9 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde die RNA erst mit einer Pyrophosphatase (TAP) dephosphoryliert, anschließend das Linker-RNA-Oligonukleotid an das 5'-Ende ligiert und eine RT-PCR mit dem Primer Om09 durchgeführt. Mit der erzeugten c-DNA (223 Nukleotide) wurde eine PCR durchgeführt unter Verwendung eines Vorwärtsprimers, der dem Linker-Oligonukleotid (Om15) entsprach und eines Reversprimers (Om16) der 5'-wärts versetzt zum RT-PCR-Primer

passte. Wie Abbildung 2.10 A zeigt, konnte ein Fragment von 124 Nukleotiden amplifiziert werden, dass nur in der Probe unter Verwendung der gesamt-RNA aus den LPM zu finden war. Dieses Fragment wurde dann in pGEMT kloniert und in DH5a vermehrt. Aus 20 Klonen wurden die Plasmide isoliert und sequenziert. Die Sequenzdaten ergaben einen Transkriptionsstart (+1), der mit einem G anfängt und 27 Basepaare vom Translationsstart entfernt liegt.

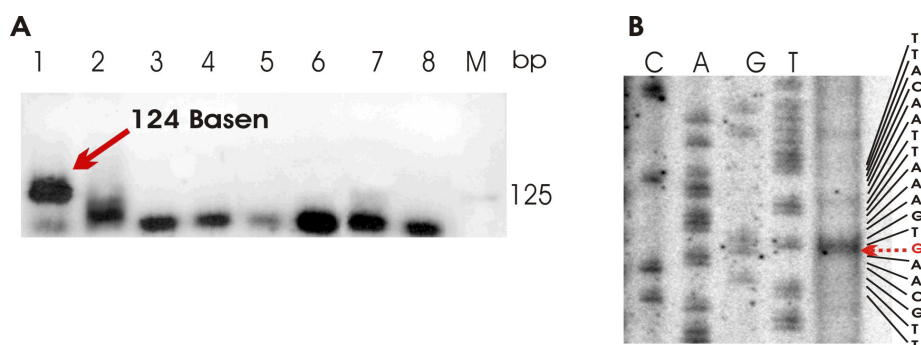


Abbildung 2.10: **Bestimmung des Transkriptionsstarts**; A) Das PCR-Ergebnis der PCR der 5' RACE unter der Verwendung der Primer Om15 und Om16 und der c-DNA aus der RT-PCR mit Om09 Primer. 1 = vollständige 5' RACE mit gesamt RNA aus der LPM-Kultur und 2 = HPM-Kultur, Kontrollreaktion ohne Pyrophosphatasebehandlung (LPM) = 3 und (HPM) = 4, Kontrollreaktionen mit CIAP- statt Pyrophosphatasebehandlung (LPM) = 5 und (HPM) = 6, Kontrollreaktionen mit DNA 7 (Pyrophosphatase) und 8 (CIAP), M = Lambda DNA *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. B) Primerextensionanalyse; Die reverse Transkription wurde mit 10 µg gesamt RNA aus der LPM-Kultur und 5' [γ^{32} P]-Om16 Primer durchgeführt. Die oben angeführten Buchstaben stellen die Nukleotide des codierenden Stranges dar.

Die Primerextension wurde mit 10 µg gesamt-RNA und dem Om16 Primer nach dem Protokoll von Fermentas (MuLV-Reverse Transcriptase) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Die erhaltene c-DNA entsprach ebenfalls dem 27 Basenpaare vom Translationsstart entfernten G (Abbildung 2.10 B). Daraus ließ sich die -10 Region mit der Sequenz TACAAT ableiten. Allerdings befand sich keine dem Konsensus entsprechende -35 Region in der üblichen 17 bp Entfernung, dafür aber eine 21 bp entfernte Sequenz, die mit der Sequenz TTAACA dem Konsensus (TTGACA) recht nahe kommt. Ausgehend von dieser vermeintlichen -35 Region lag die Sequenz TATTTT 16 bp entfernt, was dem -10 Konsensus auch nahe kommt.

Analyse des Terminators

Um das 3'-Ende des Phytasegens zu analysieren wurde ein 297 bp Fragment mit den Primern Om13 und Om33 amplifiziert, in pGEMT kloniert und in *E. coli* DH5α vermehrt. Der Primer Om13 passte zur kodierenden *phyC*-Region und wurde an Hand

der vorhandenen Sequenzdaten entworfen. Der Om33 Primer wurde an Hand der Genomsequenzierungsdaten von *B. amyloliquefaciens* FZB42, der eng verwandt mit dem FZB45 Stamm ist, ermittelt. Er alignte zwischen +1403 und +1435 relativ zum +1 des *phyC*-Gens, und damit 260 bp hinter dem Stoppkodon. Nach der Sequenzierung wurden die Daten mit denen aus verschiedenen *Bacillus* Spezies, unter anderen *B. amyloliquefaciens* FZB42, verglichen und eine Faltungsvorhersage des Terminators durchgeführt (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>).

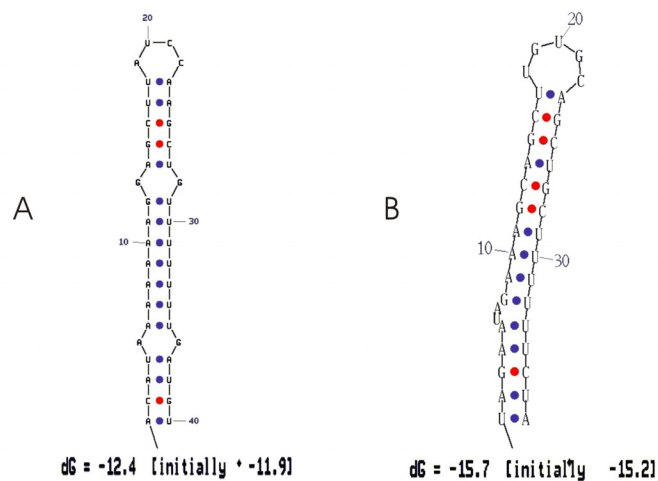


Abbildung 2.11: **Vorhersage der Terminatorstruktur des *phyC*-Gens** von *B. amyloliquefaciens* FZB45 (A) und *B. subtilis* 168 (B); erstellt unter <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>.

Im Rahmen einer digitalen Analyse an 463 verschiedenen experimentell als terminierend bekannten Sequenzen und 567 nicht terminierenden Sequenzen aus *Bacillus subtilis* 168, haben de Hoon und Mitarbeiter (de Hoon et al., 2005) den *phyC*-Terminator als Rho-unabhängig eingeordnet. Ein Vergleich mit anderen Sequenz- und Literaturdaten lässt darauf schließen, dass der *phyC*-Terminator aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 ebenfalls Rho-unabhängig ist. Ein Alignment mit eng Verwandten *Bacillus* Spezies (Anhang) zeigte deutlich, dass die Sequenz des Terminators von FZB45 eine ausgeprägte palindromische Struktur aufweist, die stärker innerhalb der *Bacillus* Spezies konserviert ist, als die von *B. subtilis* 168 (Anhang, 7.2.1). Die Vorhersage der RNA-Faltung ergab eine sehr symmetrische Terminationsschleife für die *B. amyloliquefaciens* FZB45 und eine rechts gekrümmte Hairpin-Struktur für die *B. subtilis* 168 *phyC*-RNA (Abbildung 2.11). Die freie Enthalpie wurde für *B. subtilis* 168 mit $dG = -15,7$ kcal/mol und für *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit $dG = -12,4$ kcal/mol ermittelt. Damit ist die Terminationsstruktur von *B. amyloliquefaciens* FZB45 auch stabiler als die von *B. subtilis* 168.

2.3 In vivo Untersuchungen der Bindung von PhoP, RNA-Polymerase und AbrB an den *phyC*-Promotor

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die *phyC*-Expression von PhoP abhängig ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ein negativer Regulator, AbrB auch an der Regulation von *phyC* beteiligt sein könnte. Aus diesen Versuchen ging aber nicht hervor, wo diese Regulatoren an die DNA binden, um ihre Wirkung zu entfalten. Deshalb wurden weitere Expressionsversuche in *B. subtilis* mit veränderten *phyC*-Promotoren vorgenommen. Dabei wurden verkürzte, sowie mutagenisierte Promotorsequenzen, die mit *lacZ* fusioniert wurden, eingesetzt.

2.3.1 Effekt von Promotorverkürzungen auf die Reporteraktivität

Um die Stellen, an die Regulatoren binden könnten, im *phyC*-Promotor einzugrenzen, wurden folgende Mutanten hergestellt: a) Wildtyp-Hintergrund Mutanten OM145 (*phyC* -9 bis +208), OM245 (*phyC* -44 bis +208), OM345 (*phyC* -77 bis +208), OM445 (*phyC* -105 bis +208), OM545 (*phyC* -147 bis +208) und OM71 (*phyC* -287 bis +29); b) *spo0A*-Hintergrund Mutanten OM64-3 (*phyC* -77 bis +208), OM64-4 (*phyC* -105 bis +208), OM64-5 (*phyC* -147 bis +208) und OM64-7 (*phyC* -287 bis +29) (siehe auch Abbildung 2.12).

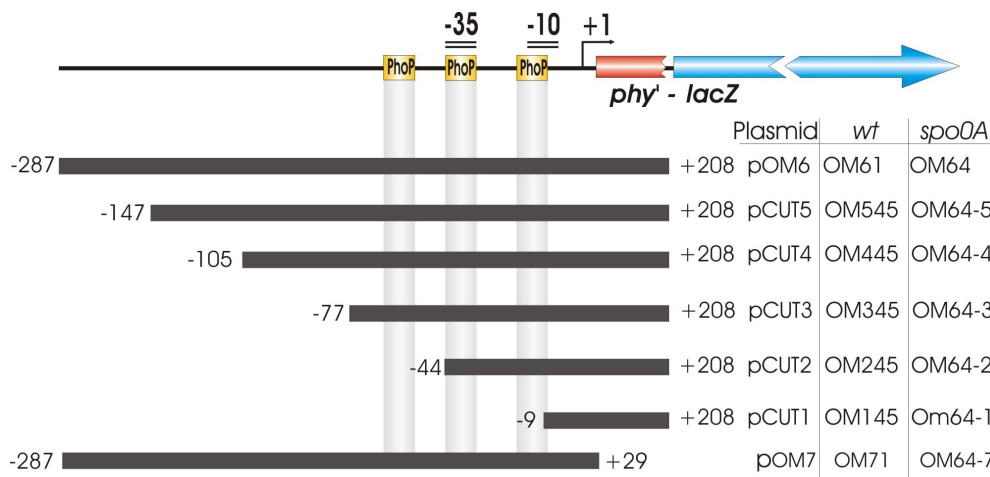


Abbildung 2.12: Darstellung der verkürzten Promotorbereiche, die mit *lacZ* (blauer Pfeil) fusioniert wurden; Der unverkürzte *phyC*-Promotor OM61 ist ebenfalls dargestellt; Oben sind die Promotorstrukturen (-10 und -35 unterstrichen) und die vermeintlichen PhoP-Boxen (gelb) sowie die 75 Basenpaare der kodierenden Region (rot) gekennzeichnet. Die Bezeichnungen der Plasmide und der damit hergestellten Mutanten im Wildtyp- und *spo0A*-Hintergrund sind in der Tabelle rechts zusammengefasst. Die Positionen der Fragmente in *phyC*-Promotor sind links und rechts angegeben.

Expression im Wildtyp-Hintergrund

In der ‚upstream‘ Region von *phyC* wurde eine –10 Region zwischen –7 und –12 und eine –35 Region zwischen –34 und –39 vermutet. Diese –10 Region wird überlagert von einer möglichen PhoP-Bindungsstelle, die sich zwischen –8 und –13 befindet. Zwei mögliche PhoP-Boxen befinden sich bei –42 bis –47 und –34 bis –39 (diese deckt genau die –35 Region). Die Mutante OM145 beinhaltet keine dieser Strukturen, OM245 besaß beide Promotorsequenzen (–10 und –35) und nur die ersten zwei PhoP-Boxen. OM345 enthielt beide Promotorstrukturen und alle PhoP-Boxen, die OM445 und OM545 waren um jeweils ca. 30 bp länger.

Die Mutanten OM145 und OM245, zeigten keine Reporteraktivitäten, auch wenn OM245 sowohl die –10, als auch die –35 Region enthielt (Abbildung 2.13 A). Das bedeutet, dass die Promotorstrukturen allein nicht ausreichend für die Expression von *phyC* waren. Die Mutante OM345 zeigte fast drei mal so hohe Aktivitäten (269 %), wie der unverkürzte Promotor (OM61). Da erst ab dieser Verkürzung Aktivität messbar war, stellte der Bereich bis –77 den kürzesten funktionsfähigen Promotor dar. Die Aktivitäten des Reporters nahmen mit längeren Promotorbereichen schrittweise ab, mit 190 % bei OM454 und 146 % bei OM545. Dies könnte darauf hinweisen, dass weitere Faktoren an der Regulation des Phytasegens beteiligt sind, deren Bindungsstellen oberhalb von –77 liegen. Die Wirkung dieser muss demnach reprimierender Natur sein.

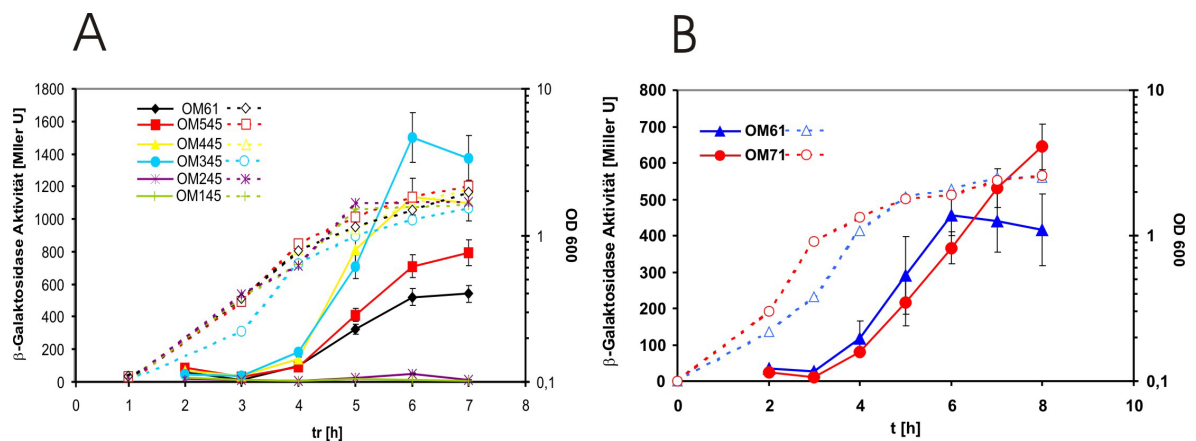


Abbildung 2.13: **Expression des Reporters unter der Kontrolle von verkürzten *phyC*-Promotorfragmenten** im Vergleich zu dem ungekürzten Promotor (OM61); β-Galaktosidase Aktivität und Wachstum (OD600) in den Mutanten mit (A) 5'- Verkürzungen und (B) 3'-Verkürzung. Aktivitäten sind mit durchgehenden Linien und geschlossenen Symbolen und Wachstum mit gestrichelten Linien und offenen Symbolen dargestellt.

Eine 3'-Verkürzung des *phyC*-Promotors wurde ebenfalls in der OM71 Mutante vorgenommen und untersucht. Bis zur sechsten Stunde Wachstum unterschied sich

die Reporteraktivität kaum von der OM61 (unverkürzter Promotor) (Abbildung 2.13 B). Nach 6 Stunden zeigte OM61 die maximale Aktivität, die dann bei längerer Inkubation (7 und 8 Stunden) fiel, wogegen die Aktivität bei OM71 weiter stieg. Dies könnte auf die Interaktion eines Regulators unterhalb von +29 hindeuten, der die Expression der Phytase in der stationären Phase negativ reguliert.

Während des Wachstums dieser verschiedenen Mutanten im HPM wurden, so wie auch bei OM61, nur sehr niedrige β -Galaktosidase Aktivitäten gemessen (unter 10 %). Damit wurde bei keiner Verkürzung eine Entkoppelung des *phyC*-Promotors von der Phosphatmangelantwort erreicht.

Expression im *spoOA*-Hintergrund

Da bereits in den vorhergehenden Tests ein Zusammenhang mit AbrB hergestellt werden konnte, wurde die Aktivität der verkürzten *phyC*-Promotoren in dem *spoOA*-Hintergrund getestet, wo AbrB überexprimiert wird. Da die kürzesten Promotoren keine Aktivitäten im Wildtyp-Hintergrund (OM145 und OM245) zeigten, wurden diese hier nicht mitgeführt.

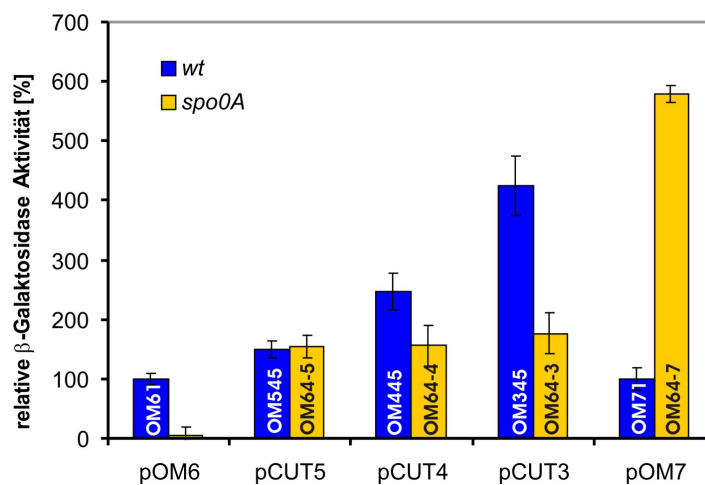


Abbildung 2.14: **Aktivität der verkürzten *phyC*-Promotorfragmenten in der *spoOA*-Mutanten** (gelb) im Vergleich zu der Expression im Wildtypmutanten (blau) und dem ungekürzten Promotor in wt und *spoOA*-Hintergrund. An der X-Achse wurden die Plasmide aufgeführt, mit denen die Mutanten transformiert wurden. Die Mutantenbezeichnungen sind in den Säulen dargestellt.

Die verschiedenen Promotorfragmente zeigten ein anderes Verhalten in der *spoOA*-Mutante als im Wildtyp. Wie in der Abbildung 2.14 zu erkennen ist, zeigte die OM64-Mutante (transformiert mit pOM6) weniger als 10 % der Aktivität im Vergleich zum gleichen Fragment im Wildtyp (OM61). Das spricht für die Wirkung des AbrB-Repressors. Wurde der Promotor 5'-wärts um 140 Basenpaare verkürzt (-147 bis 208,

transformiert mit pOM5), stieg die Aktivität in der OM64-5- Mutante sowie der vergleichbaren Wildtypmutante OM445 auf ca. 150 %. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Bindungsstelle für einen Repressor oberhalb von -147 liegen muss. Wurde der Promotor weiter 5'-wärts verkürzt (pCUT4→OM64-4 und pCUT3→OM64-3), änderte sich die Reporteraktivität nicht, während sie im Wildtyphintergrund stieg. Das AbrB, welches im *spoOA*-Hintergrund überexprimiert wurde, hat nach Entfernen der Sequenz oberhalb von -147 die Promotoraktivität auf einem konstanten Level von 150 % gehalten. Der 3'-verkürzte Promotor (-87 bis +29) in der OM64-7-Mutante (transformiert mit pOM7) exprimierte fast 6 mal stärker als in OM71. Bei dieser Verkürzung könnte eine AbrB-Bindungsstelle unterhalb von +29 entfernt worden sein. Diese würde auch erklären, warum die *phyC*-Expression nach der 5'-Verkürzung nicht wie im Wildtyp stieg, sondern konstant blieb. Andererseits ist die Aktivität nicht vollständig ausgefallen beim Entfernen der ‚upstream‘-liegenden möglichen AbrB-Bindungsstelle. AbrB ist ein Aktivator des Pho-Regulons. Durch die verstärkte *phoPR*-Expression in der AbrB-konstitutiven *spoOA*-Mutante ließe sich die verstärkte *phyC*-Expression in OM64-7 (im Vergleich zu OM71) erklären.

2.3.2 Auswirkung von Basensubstitutionen auf die Reporteraktivität

Da aus den vorhergehenden Experimenten mit verkürzten Promotorbereichen der Bereich bis -77 als Target für PhoP eingegrenzt werden konnte, wurden innerhalb dieser *phyC*-Sequenz einzelne oder mehrere Basen mittels der ‚site directed‘ Mutagenese ausgetauscht. Die generierten Mutanten wurden entsprechend der Mutationsposition bezeichnet: MUT49 → Basensubstitution an Position -49 etc. Durch dieses Mutantenscreening sollten die Stellen bzw. einzelne Basen ausfindig gemacht werden, die an der PhoP und / oder der RNAP-Bindung beteiligt sind.

Die -10 Region

In der ‚upstream‘ Sequenz von *phyC* befinden sich zwei Sequenzmotive die der -10 Region ähneln: 1. TATTTT von -17 bis -12, 2. TACAAT von -12 bis -7. Um zu klären, welcher dieser Motive die -10 Funktion inne hat, wurden die Basensubstitutionen an den Positionen -17 (T:C), -11 (A:G) und -7 (T:G) vorgenommen. Die Austausche an -11 und -7 führten zu einem totalen Ausfall der Promotoraktivität, wogegen die Transition an -17 immer noch 83 % der

Reporteraktivität zeigte. Damit konnte die Sequenz TATTTT als -10 Region ausgeschlossen und die Sequenz TACAAT als die -10 Region ermittelt werden.

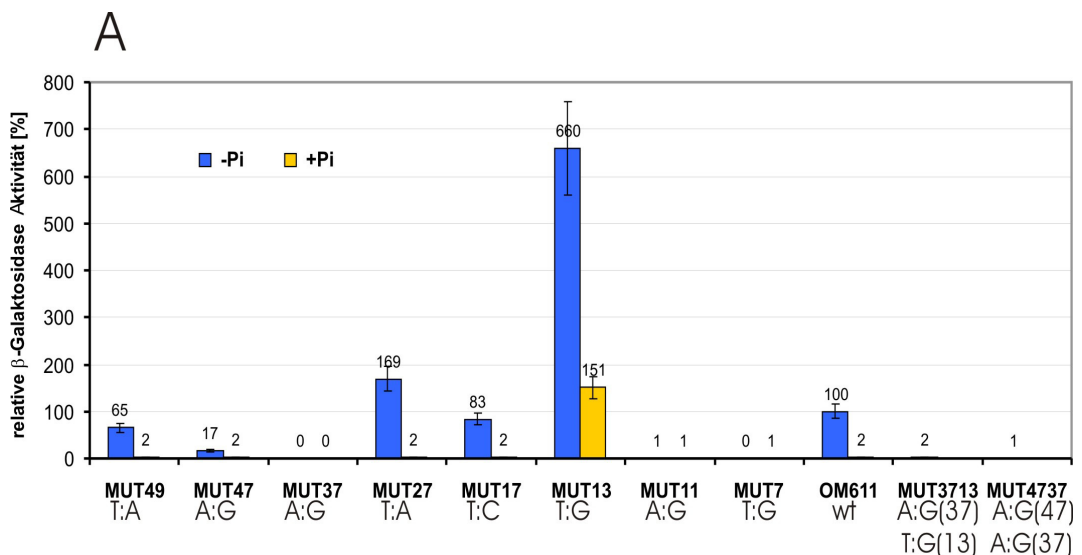
Da die Aktivität in MUT17 um immerhin fast 20 % gesunken war, stellte sich hier die Frage, ob dieser Bereich trotzdem eine für die Expression wichtige Struktur enthält. In der Literatur wurde bereits 1995 für Gram-positive Bakterien eine -16 Region beschrieben, die das Motiv TRTG(n) ausweist (Voskuil *et al.*, 1995, Voskuil und Chambliss, 1998). Im *phyC*-Promotor befinden sich zwei solcher Motive, ⁻²¹TGTA TGTA⁻¹⁶, allerdings nicht exakt bei -16. Das -16 Motiv, auch 'extended'-10 Region genannt, stabilisiert den offenen Initiationskomplex. Mutationen an -15 (G:C) im *amy*-Gen von *B. subtilis* führten zur einer fast vollständigen Inaktivierung der Transkription, Basensubstitutionen in den anderen Basen senkten die Transkriptionsrate signifikant (Voskuil und Chambliss, 1998). Die hier durchgeführte Basensubstitution T:C (-17) hat möglicherweise ein solches -16 Motiv getroffen, was die niedrigere Reporteraktivität erklären könnte.

Die PhoP-Box an der -10 Region

Die -10 Region überschneidet sich um eine Base mit einer möglichen PhoP-Bindungsstelle TTACAA von -13 bis -8. Damit hatte die Substitution an -11 nicht nur die -10 Region, sondern auch eine PhoP-Bindungsstelle getroffen und machte die Aussage über die Funktion dieser Base nicht möglich. Deshalb wurde eine Transversion an -13 (T:G) vorgenommen um das PhoP-Motiv zu entfernen. Diese Base gehört nicht zur -10 Region, sondern nur zum PhoP-Motiv. Dieser Austausch führte zu einer fast 7 mal höheren Reporteraktivität, die sogar in Anwesenheit von Phosphat mit 150 % messbar war. Dies war der Beweis, dass das PhoP-Motiv an der -10- Region die *phyC*-Expression stört. Die Substitution an -11 wirkte sich nur auf die -10 Funktion aus. Da PhoP-Erkennungssequenzen üblicherweise in zwei Tandem-Motiven (also 4 Bindungsstellen) vorkommen (Liu and Hulett, 1997, Liu *et al.*, 1998a), wurde eine Sequenz, die dem Konsensus (TT(T/A/C)ACA) mit den ersten vier Basen entspricht (TTCCTG) und sich zwischen -27 und -22, an der Position -27 (T:A) substituiert. Auch diese Transversion erhöhte die Reporteraktivität auf ca. 170 %, allerdings nur unter Phosphatmangel. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Motiv eine PhoP-Box darstellt, welche die Expression stimuliert. Falls hier eine PhoP-Interaktion stattfindet, hat diese eher einen negativen Einfluss.

Die -35 Region und das PhoP-Tandemmotiv

Drei Basensubstitutionen wurden in den zwei möglichen PhoP-Bindungsstellen zwischen -34 und -50 durchgeführt. Die Transversion T:A an -49 hatte eine Verringerung der Reporteraktivität auf 65 % und die Transition A:G an -47 auf 17 %, zur Folge. Diese PhoP-Bindungsstelle ist demnach wichtig für die *phyC*-Expression, wobei das A an Position -47 eine stärker konservierte Base zu sein scheint als das T an -49. Die Sequenz von -34 bis -39 könnte neben der PhoP-Bindungsstelle, ebenfalls eine mögliche -35 Position sein, hier weicht lediglich das A (-37) vom Konsensus TTGACA der RNA-Polymerase ab. Der Austausch von A nach G an der Position -37 stellte den -35 Konsensus wieder her, zerstörte aber die PhoP-Box und führte zum Verlust der Reporteraktivität.



B

-49 -47 -37 -27 -17 -13 -11 -7
OM611: TTCACA AAAAC TTAACA CTGA ACTTCCTGTATGTATT TTACAATT

Abbildung 2.15: **Expression des Reporters unter der Kontrolle der mutagenisierten *phyC*-Promotoren;** Die Bezeichnungen der Mutanten beinhalten die Positionen der Mutationen, die Basensubstitutionen sind unten aufgeführt. Die Kulturen wurden in LPM (blau) und HPM (gelb) inkubiert.

Um auszuschließen, dass die PhoP-Box zwischen -44 und -50 die RNAP-Bindung an die -35-Konsensusregion (MUT37) stört, wurde eine weitere Mutation an der Position -47 vorgenommen. Durch die Transitionen an -47 (A:G) und -37 (A:G) sollte eine konservierte -35 Region erzeugt und gleichzeitig die PhoP-Motive aufgelöst werden. Diese Mutante (MUT3747) zeigte allerdings keine Reporteraktivitäten mehr. Auch die zweite Doppelmutante MUT1337 sollte durch die Transition A:G (-37) den -

35 Konsensus beinhalten und die –10 Region, durch die Transversion T:A (-13), von der störenden PhoP-Bindungsstelle befreien. So sollte überprüft werden, ob der Ausfall der Aktivität in MUT3747 nur durch die PhoP-Box an der –10 Region verursacht wurde. Auch diese Mutante besaß keine Reporteraktivität. Ein konstitutiver, PhoP-unabhängiger *phyC*-Promotor konnte durch die Doppelmutationen nicht hergestellt werden. Damit konnte bestätigt werden, dass die Funktion der –35 Region als PhoP-Bindungsmotiv für die *phyC*-Expression unerlässlich ist.

2.3.3 Reporteraktivität in Deletionsmutanten

Durch die Substitutionsmutagenese konnte die Position der –10 Region und der PhoP-Boxen identifiziert werden. Auch die Funktionen der PhoP-Bindungsstellen konnte gut zugeordnet werden, aber die Rolle der vergrößerten Entfernung zwischen der –10 und –35 Position wurde damit noch nicht geklärt. Zu diesem Zweck wurde in den Promotor eine 4 Basendeletion zwischen –27 und –24 (Mutante DEL1) sowie auch Basensubstitutionen eingeführt: DEL13 hat eine zusätzliche Mutation T:G (-13); DEL37 A:G (-37), DEL1337 T:G (-13) und A:G (-37), DEL3747 A:G (-37) und A:G (47).

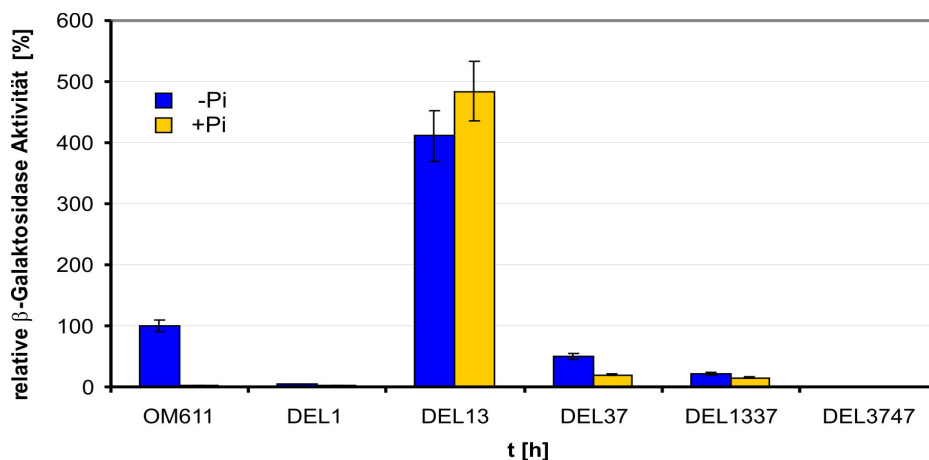


Abbildung 2.16: **Expression des Reporters unter der Kontrolle der deletierten und mutagenisierten *phyC*-Promotoren;** Alle DEL-Mutanten besaßen eine Deletion zwischen –27 und –24; DEL1 wurde nicht Substituiert, DEL13 hat eine Mutation T:G (-13); DEL37 A:G (-37), DEL1337 T:G (-13) und A:G (-37), DEL3747 A:G (-37) und A:G (47), OM61 beinhaltet den unveränderten *phyC*-Promotor. Die Kulturen wurden in LPM (blau) und HPM (gelb) inkubiert.

Wie der Abbildung 2.16 zu entnehmen ist, zeigte die DEL1-Mutante, die nur eine 4 bp-Deletion (-27 bis –24) trug, sowohl in LPM, als auch in HPM nur sehr geringe Reporteraktivitäten. Damit war allein die Verkürzung des Fensters zwischen –10 und –35 nicht ausreichend, um die *phyC*-Expression zu aktivieren. Die Mutante die neben der Deletion auch noch eine Basensubstitution A:G an der Position –37 trug, und

damit den perfekten Konsensus für die RNA-Polymerase besaß (DEL37), zeigte 50 % der Promotoraktivität im LPM und 20 % im HPM. Damit schien diese zusätzliche Basensubstitution die Expression zu verstärken und umgekehrt. Denn vergleicht man die DEL37- mit der MUT37-Mutante, die nur die Transition A:G (-37), aber keine Deletion besaß und unter keinen Bedingungen Reporteraktivität zeigte (vergleiche Abbildung 2.15) verbesserte die Deletion den Promotor ebenfalls. Allerdings scheint auch bei dem verkürzten und damit optimalen Fenster von 17 Basenpaaren, PhoP eine aktivierende Rolle zu spielen. Denn obwohl nur noch eine PhoP-Box bei -45 bis -50 vorhanden war, waren die Aktivitäten in LPM höher als im HPM. Dafür spricht auch die Tatsache, dass nach der Mutagenese beider ‚upstream‘-liegender PhoP-Boxen (DEL3747) keine Promotoraktivität mehr messbar war, trotz des verkürzten Fensters.

Die Doppelmutation (-13 T:G und -37 T:A) und gleichzeitige Verkürzung des Fensters bei DEL1337 führte zu einer *phyC*-Expression mit 20 % Aktivität im LPM und 15 % im HPM. Im Vergleich zur Mutante MUT1337 (vergleiche Abbildung 2.15), die keine Deletion besaß und keine Aktivität in beiden Medien zeigte, erhöhte die Deletion hier die Promotoraktivität. Vergleicht man aber DEL37 mit DEL1337, so wirkte sich die Transversion A:T an -13 bei gleichzeitiger Transition A:G an -37 eher negativ auf die *phyC*-Expression in den Deletionsmutanten aus. Es wäre denkbar, dass in dem stärker konservierten Promotor die veränderte -13 Base (G) ungünstig für die RNAP-Bindung war. Es scheint, dass die PhoP-Box an der -10 Region nicht mehr entscheidend für die *phyC*-Expression gewesen ist, wenn die -35 Region dem Konsensus entsprach.

Mutante DEL13, die neben der Deletion auch eine Transversion A:T an der -13 Position besaß, exprimierte 4,2 mal stärker im LPM und 4,8 mal stärker im HPM, als der unveränderte Promotor. Das könnte darauf hinweisen, dass die intakten PhoP-Boxen (zwischen -50 bis -34) bei hoher PhoP~P-Konzentration (LPM), die *phyC*-Expression sogar etwas stören im Vergleich zur niedrigen PhoP~P-Konzentration (im HPM).

Durch das Entfernen der PhoP-Box bei -10 und gleichzeitiger Verkürzung des Fensters auf 17 bp (DEL13) wurde ein konstitutiver *phyC*-Promotor erzeugt. Bei weiterer Transition A:G bei -37 war die Expression zwar weiterhin konstitutiv in LPM aber wesentlich höher als im HPM. PhoP~P schien im LPM, wo dessen Konzentration hoch ist, die Promotoraktivität trotz der fehlenden PhoP-Box an -35, zwar nur wenig, aber doch messbar zu fördern: Unterschied der Aktivitäten in HPM zum LPM bei DEL1337 von 5 % und bei DEL37 von 30 %. Da DEL13, trotz der PhoP-Box an -35, die höchsten Aktivität zeigte, würde dies die Annahme stützen, dass die PhoP-

Bindungsstelle wesentlich wichtiger für die *phyC*-Transkription zu sein schien, als eine konservierte -35 Region. Möglicherweise stützte sich hier die PhoP-vermittelte *phyC*-Expression nur auf die erste PhoP-Box (-45 bis -50), da alle DEL-Mutanten mit Substitutionen an -37 Aktivität aufwiesen, ausgenommen DEL3747, wo die erste PhoP-Box ebenfalls mutagenisiert wurde.

2.4 *In vitro* Untersuchungen der Bindung von PhoP, RNA-Polymerase und AbrB an den *phyC*-Promotor

Für die *in vitro* Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen der *phyC*-Promotor DNA und Proteinen, wurden zuerst die Proteine PhoP und PhoR231 gereinigt (Abbildung 7.4 A und B). Hierbei war die Funktionalität von PhoP und PhoR231 besonders wichtig, deshalb wurden sie in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay überprüft. Die Übertragung der Phosphatgruppe von PhoR231~P auf PhoP konnte erfolgreich nachgewiesen werden (Anhang, Abbildung 7.4). Wie der Abbildung 7.4 C zu entnehmen ist, wurde bereits nach 90 Sekunden das PhoR231 autophosphoryliert. Bei der Transphosphorylierung war die Phosphatgruppe bereits nach 30 Sekunden fast vollständig vom PhoR231 auf PhoP übertragen worden. Auch die RNA-Polymerase assoziiert mit σ^A wurde gereinigt und in einer SDS-PAGE überprüft (Abbildung 7.5), sowie das AbrB (Daten nicht gezeigt).

2.4.1 Bindung der Proteine an *phyC* in Gelretardations-Assays

Für die Gelretardationsanalyse (auch EMSA genannt) wurde das radioaktiv markierte 511 bp lange *phyC*-Promotorfragment, korrespondierend zum ungekürzten *phyC*-Promotor bei den *in vivo* Analysen, verwendet. Dieses wurde im Bindungspuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen von PhoP, PhoR231 und RNAP mit 5 mM ATP, bzw. mit AbrB ohne ATP inkubiert. (genauer in 5.2.12).

Bindung von PhoP und PhoP~P an den Promotor

Die mit PhoP inkubierten *phyC*-Promotor-Fragmente zeigten bis zu einer Konzentration von 1,6 μ M PhoP kein verzögertes Laufverhalten (Abbildung 2.17 A). Damit hatte unphosphoryliertes PhoP nicht an die DNA gebunden. Für PhoP-induzierte Promotoren, wurde die Bindung sowohl von PhoP~P, als auch PhoP beschrieben,

allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten, wobei PhoP~P wesentlich stärker an die Promotoren bindet (Liu und Hulett, 1997). Möglicherweise war die hier verwendete Konzentration von 1,6 μM zu niedrig, um die DNA zu binden. Die mit phosphoryliertem PhoP~P inkubierten DNA-Fragmente zeigten eine konzentrationsabhängige Laufverzögerung. Dabei ‚shifteten‘ die DNA-Proben um so stärker, je mehr PhoP~P darin enthalten war. Das könnte ein Indiz für mehrere Bindungsstellen für PhoP~P sein, die konzentrationsabhängig gesättigt werden. Bei sehr hohen PhoP~P-Konzentrationen (1,6 μM) ist aber eine unspezifische Bindung nicht auszuschließen.

Somit kann man sagen, dass phosphoryliertes PhoP (PhoP~P) an den *phyC*-Promotor bindet.

Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor

Die RNA-Polymerase allein war nicht im Stande, das Laufverhalten der DNA zu verändern. In der Abbildung 2.17 B sind links die Proben, welche nur mit RNAP inkubiert wurden, zu sehen. Bis zu einer Konzentration von 0,04 μM war keine Bindung der RNAP an den *phyC*-Promotor sichtbar. In weiteren Versuchen wurden bis zu 0,78 μM RNAP mit dem *phyC*-Promotor inkubiert, erst hier kam es zu einem schwachen ‚Shift‘ (nicht dargestellt). Ein ‚Supershift‘ wurde beobachtet nach der Inkubation des *phyC*-Promotors in Anwesenheit von 0,2 μM PhoP~P und 0,02 μM RNAP (Abbildung 2.17 B, rechts). Links daneben beladen, sieht man den Promotor mit der gleichen PhoP~P-Menge ohne RNAP, diese DNA-Bande wurde wesentlich weniger ‚geshiftet‘. Es reichten schon geringe Konzentrationen von PhoP~P aus, um die RNAP an die DNA zu binden. Wurden den Reaktionen, bei konstanter RNAP-Menge von 0,02 μM , steigende PhoP~P-Konzentrationen zugesetzt, wurde der Shift erst schwächer (bei 0,4 μM PhoP~P), dann wieder stärker (0,8 μM PhoP~P). Wurde die PhoP~P-Menge auf 0,8 μM erhöht, so gleichen sich die beiden Banden, aus den Proben mit und ohne RNAP, fast in ihrer Retardation. Das könnte auf eine Verdrängungsreaktion der RNAP durch höhere PhoP-Konzentrationen hindeuten, denn binden beide Proteine, wird die geshiftete Masse durch die RNAP (340 kDa) sehr groß. Wird die RNAP verdrängt und PhoP~P (29 kDa) bindet verstärkt an die DNA, so ist die geshiftete Masse geringer und der Shift schwächer.

Das bedeutet, dass phosphoryliertes PhoP~P die Bindung der RNAP an den *phyC*-Promotor fördert und bei hohen Konzentrationen stört.

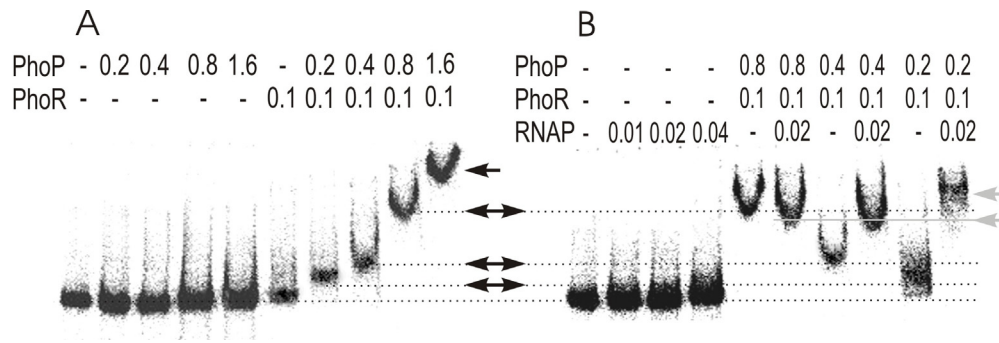


Abbildung 2.17: **Gelretardations-Assay mit PhoP und RNAP**; (A) Der ^{32}P -markierte *phyC*-Promotor wurde mit PhoP und PhoP~P (PhoP + PhoR231) inkubiert. (B) Der *phyC*-Promotor wurde mit PhoP~P (PhoP + PhoR231) und RNA-Polymerase (RNAP) inkubiert. Die Proteinkonzentrationen sind oben aufgeführt [μM]. Die schwarzen Pfeile zeigen durch PhoP~P verursachte Shifts, die grauen Pfeile die durch RNAP verursachten Shifts. Die Proben wurden in einer nativen Acrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Als Kontrolle wurde eine Reaktion mit PhoR allein angesetzt, diese zeigte keine Retardation.

Bindung von AbrB den *phyC*-Promotor

AbrB war im Stande den *phyC*-Promotor konzentrationsabhängig zu ‚shiften‘. Bei Konzentrationen von 1 μM und 1,4 μM konnten nur sehr schwache Laufverzögerungen verzeichnet werden. Wurde die AbrB-Menge auf 1,7 μM erhöht, konnte man deutlich eine Retardation erkennen, die wesentlich sichtbarer bei höheren AbrB-Konzentrationen war. Ab 2,4 μM AbrB wurde die gesamte *phyC*-DNA ‚geshiftet‘. Bei diesem Protein schmierte die ‚geshiftete‘ Bande, was aber nicht ungewöhnlich für AbrB ist. Dies ist die Folge der Bildung von größeren Aggregaten durch AbrB, was bereits früher in Gelretardationsanalysen beschrieben wurde (Strauch *et al.*, 1989 a und b).

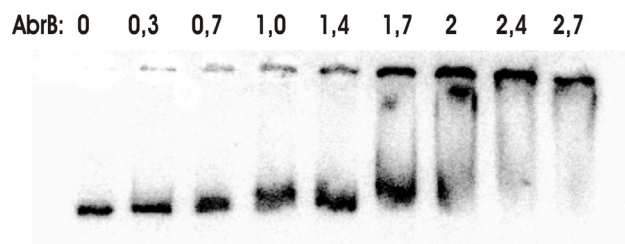


Abbildung 2.18: **Gelretardations-Assay mit AbrB**; Der ^{32}P -markierte *phyC*-Promotor wurde mit unterschiedlichen AbrB-Mengen inkubiert. Die Konzentrationen in μM sind oben aufgeführt.

Damit bindet auch AbrB an den *phyC*-Promotor, allerdings erst bei hohen Konzentrationen. Wobei dies relativiert werden muss, da nicht bekannt ist ob AbrB hier in einer multimeren Form, z. B. als Tetramer bindet. Damit wäre die Konzentration an wirkendem Protein vier mal niedriger und lege somit bei ca. 0,6 μM .

2.4.2 *In vitro* Transkription von *phyC*

Die *in vitro* Transkription (5.2.14) des 511 bp Wildtyp-Fragmentes wurde mit unterschiedlichen RNAP- und PhoP~P- Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurden die Transkriptionsreaktionen mit steigenden RNAP-Konzentrationen (30 nM – 120 nM) mit und ohne PhoP~P (60 nM), sowie mit konstanter RNAP-Menge (60 nM) und steigender PhoP~P-Konzentration (30 nM – 300 nM) angesetzt. Die Transkription des MUT13-Fragmentes wurde nur mit steigenden RNAP-Konzentrationen, sowie mit steigenden PhoP~P-Konzentrationen bei konstanter RNAP-Konzentration durchgeführt. Das erwartete Transkript hatte eine Größe von 221 bp.

Aktivierung der Transkription durch PhoP

Wie der Abbildung 2.19 zu entnehmen ist, war keine Transkription unter Verwendung der RNA-Polymerase allein (aus *B. subtilis* 168) nachweisbar, sowohl bei der OM61 Mutante (Promotor unverändert) als auch bei der MUT13 Mutante (Basensubstitution an –13 T:G). Bei konstanter PhoP~P-Konzentration von 60 nM stieg die Transkriptmenge proportional mit der eingesetzten RNAP-Konzentration. Unerwartet war die Tatsache, dass für die Transkription des mutagenisierten Promotors aus MUT13, der eine 6,6 mal höhere Expression des Reporters in LPM und 1,5 mal höhere Expression in HPM zeigte, die RNAP allein nicht genügte. Auch dieser Promotor benötigte PhoP~P.

Transkriptionsrate bei hohen PhoP~P-Konzentrationen

Die Transkription des wt-Promotors bei konstanter RNAP-Menge (60 nM) und steigender PhoP~P-Konzentration zeigte ein interessantes Verhalten (Abbildung 2.19 A). Bei einem Verhältnis von 60 nM RNAP und 30 nM PhoP~P war nur ein schwaches Transkript zu erkennen. Wurde die PhoP~P-Konzentration weiter erhöht bei konstanter RNAP-Menge (60 nM), so stieg auch anfänglich die Transkriptmenge und erreichte bei 120 nM PhoP~P die stärkste Transkriptbande. Bei weiterer Erhöhung der PhoP~P-Konzentration wurde die Bandenstärke schwächer und blieb konstant bis zur 300 nM PhoP~P. Dies zeigte, dass die Transkription bei hoher PhoP~P-Konzentration gehemmt wurde. Die Transkription des MUT13-Promotors zeigte bei den geringsten Konzentrationen von RNAP (60 nM) und PhoP~P (30 nM) ein ähnlich schwaches Transkript wie der wt-Promotor. Mit steigender PhoP~P-Konzentration, allerdings nahm

die Bandenstärke bei hohen PhoP~P-Konzentration (bis 300 nM) nicht ab, sondern nahm sogar etwas zu. Dies spricht dafür, dass die hemmende Wirkung der PhoP-Box an der -10 Region aufgehoben wurde. Interessanterweise taucht bei der Mutante eine zweite Transkriptbande unterhalb der üblichen Bande auf. Durch die Basensubstitution an -13 wurde möglicherweise die Promotorstruktur so verändert, dass nun ein alternativer Transkriptionsstart entstanden ist. Dieser müsste wenige Basenpaare unterhalb von +1 (G) liegen.

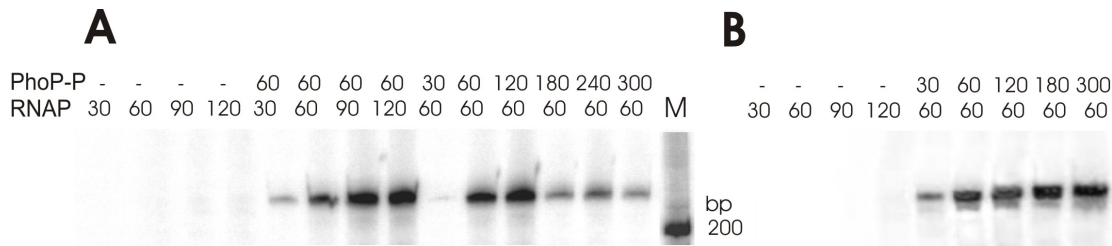


Abbildung 2.19: *In vitro* Transkriptions-Assay; (A) Als Template wurde die DNA aus der OM61 oder (B) aus der MUT13 (-13 T:G) Mutante verwendet. Das Assay wurde mit 10 nM *phyC*-DNA (511 bp) und unterschiedlichen PhoP~P und RNA-Polymerase-Konzentrationen durchgeführt. Als Größenmarker (M) wurde der ‚Low range‘-RNA-Marker (mit [γ^{32}]P gelabelt) verwendet. Proteinkonzentrationen (über den Gelen) sind in nM angegeben.

Hemmung der Transkription durch AbrB

Die Transkription wurde mit dem 511 bp Wildtyp-Fragment durchgeführt. In allen Reaktionen wurden konstante RNAP- (60 nM) und PhoP~P-Konzentrationen (60 nM) eingesetzt, die AbrB Konzentration variierte. Die DNA wurde in 11 μ l Volumen (\sim 2 x Transkriptionspuffer inkl. \sim 0,2 mg/ml poly-dIdC) mit AbrB für 10 min bei RT vorinkubiert, dann wurden die übrigen Proteine zugesetzt (Endvolumen 20 μ l). Der weitere Verlauf kann 5.2.14 entnommen werden.

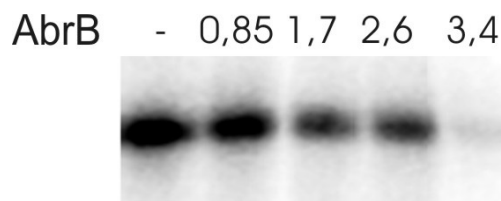


Abbildung 2.20: *In vitro* Transkription unter Einfluss von AbrB; Die AbrB-Konzentrationen sind in μ M angegeben, die Reaktionen wurden mit 60 nM PhoP~P und 60 nM RNAP durchgeführt.

AbrB reprimierte die Transkription des *phyC*-Promotors. Allerdings war der hemmende Effekt bei 1,7 μ M und 2,6 μ M AbrB auf die Transkription vergleichbar und

die Transkriptmengen gleich stark. Erst bei 3,4 μM AbrB war die Transkriptmenge sehr schwach (Abbildung 2.20). Im Vergleich zu PhoP~P (mit 30 nM), dessen Funktion die Transkriptionsaktivierung ist, waren die AbrB-Konzentrationen, die hier ein Einfluss zeigten, sehr hoch. Wurde der gleiche Versuch so durchgeführt, dass die DNA mit PhoP~P und RNAP vor AbrB versetzt wurde, konnte kein hemmender Einfluss durch AbrB beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der *phyC*-Promotor wird demnach schon bei niedrigen PhoP~P-Konzentrationen aktiviert, die Repression durch AbrB erfolgt anscheinend erst bei höheren Konzentrationen.

2.4.3 DNaseI-Footprints zur Analyse der Bindemotive

Die Footprints wurden mit unterschiedlichen radioaktiv markierten Promotorfragmenten durchgeführt: PhoP-Bindungen wurden am F1 = 159 bp Amplifikat (Primer F1for und F1rev) und F2 = 145 bp Amplifikat (Primer F2for und F2rev) untersucht, RNAP-Bindung wurde am F3 = Amplifikat (Primer Om01 und F3rev) analysiert (Abbildung 2.21). Dabei wurden jeweils die markierten kodierenden und die nicht-kodierenden Stränge für die Reaktionen mit den Proteinen eingesetzt. Hierzu muss erwähnt werden, dass bei dieser Methode keine Aussage getroffen werden kann, an welchen der DNA-Stränge die Proteine gebunden haben, denn die DNaseI schneidet immer beide Stränge, auch wenn das Protein an nur eines davon gebunden hat. Die Analyse beider DNA-Stränge ermöglicht aber eine genauere Aussage über die Position der Bindung.

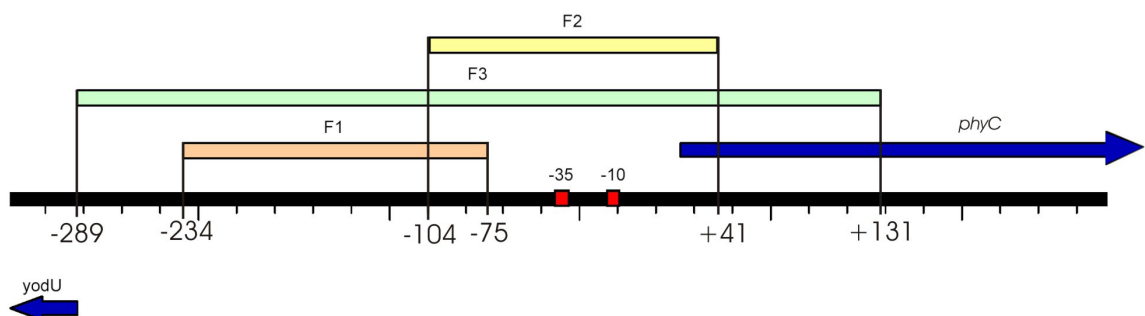


Abbildung 2.21: **Schematische Darstellung der markierten *phyC*-Bereiche**, die in den Footprint-Assays verwendet wurden, F1 war das PCR Produkt von F1for und F1rev, F2 von F2for und F2rev und F3 von OM01 und F3rev.

Bestätigung der PhoP-Bindemotive

Das 145 Basenpaare lange DNA-Fragment F2 aus dem *phyC*-Promotor (-104 bis +41) wurde mit steigenden PhoP-Konzentrationen (0,5 μ M 1,0 μ M und 1,5 μ M) mit oder ohne PhoR231 (0,4 μ M) angesetzt. Als Kontrolle wurde die DNaseI-verdaute markierte DNA, ohne Proteinzugabe (K) und als Marker eine Maxim-Gilbert-Reaktion (A+G-Sequenzierungsreaktion = M) (5.3.2) beladen.

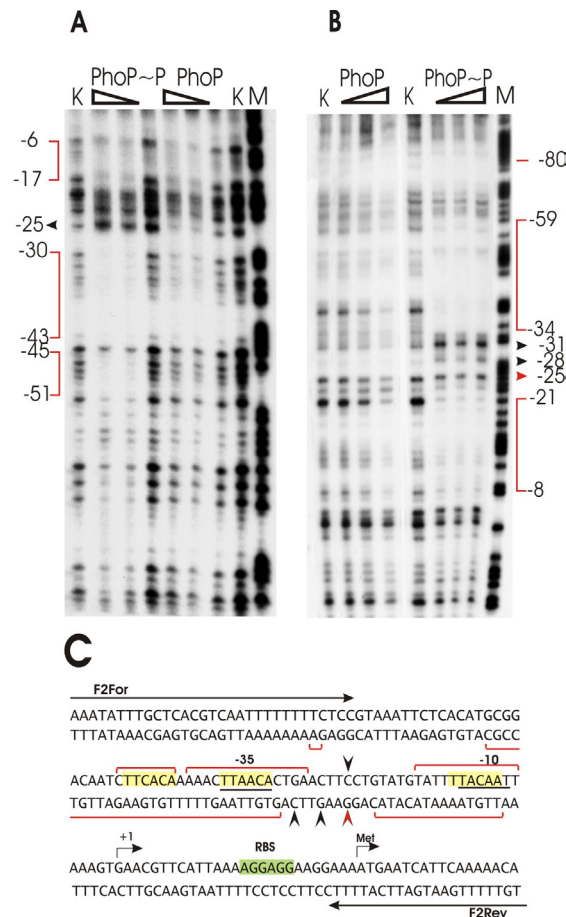


Abbildung 2.22: DNaseI-Footprint des *phyC*-Promotors gebunden mit PhoP und PhoP~P; (A) kodierender Strang und (B) nicht-kodierender Strang. Die Bindungsreaktion wurde mit 0,5 μ M, 1 μ M und 1,5 μ M PhoP mit oder ohne PhoR231 (PhoP~P) angesetzt. (C) Darstellung der korrespondierenden Sequenz des *phyC*-Promotors (beide Primer sind eingetragen). Die geschützten Bereiche sind mit roten Linien, die sensiblen Stellen mit roten und die hypersensiblen Stellen mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Die PhoP-Boxen sind gelb unterlegt und die Promotor-Strukturen schwarz unterstrichen; M= A+G-Sequenzierungsreaktion, K-Proteinfreie DNA-Probe

Wie in der Abbildung 2.22 zu sehen ist, hatte phosphoryliertes PhoP (PhoP~P) bestimmte Regionen auf den *phyC*-Promotor wesentlich besser vor dem DNaseI-Verdau geschützt als unphosphoryliertes PhoP. Dabei wurden jeweils drei geschützte Bereiche auf dem kodierenden (-51 bis -45, -43 bis -30 und -17 bis -6; Abbildung 2.22 A) und dem nicht-kodierenden Strang (-80, -59 bis -34, und -21 bis -8, Abbildung 2.22 B) gefunden. Insgesamt kann man sagen, dass PhoP~P folgende

Bereiche geschützt hat: 1) eine oder 2 Basen an der -80 Position; Da diese Stelle keine Ähnlichkeiten zu PhoP-Bindungsstellen aufweist und die Bindung nur auf dem nicht-kodierenden Strang zu sehen war, handelte es sich vermutlich um eine nicht spezifische Reaktion; 2) einen größeren Bereich von -59 bis 30, in diesem befinden sich die beiden ‚upstream‘ liegenden PhoP-Boxen und die -35 Region; 3) einen kürzeren Bereich von -21 bis -6, hier befindet sich ebenfalls eine PhoP-Box sowie die -10 Region. Zwischen den spezifischen geschützten Bereichen konnten drei hypersensitive Stellen für den DNaseI-Verdau nachgewiesen werden. Zwei der Stellen (-31 und -28) befanden sich auf dem nicht-kodierenden Strang und eine (-25) auf dem kodierenden Strang, wobei diese Position auf dem nicht-kodierenden Strang als sensitiv einzustufen war. In der Abbildung 2.22 C sind die zusammengefassten Daten auf der *phyC*-Sequenz dargestellt.

Ein äquivalenter Versuch wurde ebenfalls mit dem *phyC*-Fragment F1 (-234 bis -75) durchgeführt. Hier wurden keine PhoP-Bindungsstellen gefunden (Daten nicht gezeigt)

Bindungseffizienz der RNAP

Die Vermutung lag nahe, dass die RNA-Polymerase mit ihren 340 kDa einen größeren Sequenzbereich abdecken könnte, deshalb musste eine längere Sequenz markiert werden. Da die Markierung mit dem ³²P-F1for-Primer im ‚upstream‘ Bereich keine gute Auflösung lieferte, wurden der Primer ³²P-Om01 mit F3rev verwendet. Die markierte DNA hatte damit eine Länge von 420 bp (-289 bis -131). Die Footprints wurden mit PhoP~P (0,05 µM, 0,1 µM, 0,25 µM und 0,5 µM) allein und mit den gleichen Konzentrationen in Anwesenheit von 0,04 µM RNAP, sowie der RNAP allein (0,02 µM, 0,04 µM, 0,08 µM und 0,1 µM), durchgeführt.

Auch an diesem langen *phyC*-Promotorfragment konnte die Bindung von PhoP~P in den Regionen zwischen -59 und -34, sowie -21 und -8 bestätigt werden (Abbildung 2.23 A, links). Die Bindung an die -80 Position war hier nicht erkennbar, möglicherweise auf Grund der schlechteren Auflösung der langen Sequenz. PhoP~P zeigte keine weiteren Schutzzonen auf der Promotorsequenz.

Die RNA-Polymerase allein zeigte zwei wenig geschützte Bereiche von ungefähr -59 bis -8 und von +2 bis ca. +49 (Abbildung 2.23 A und B). Ab 0,1 µM RNAP wurden die geschützten Zonen sehr deutlich: von ca. -118 bis -67, -59 bis -8, sowie +2 bis +44. Die gleichen Bereiche wurden in Anwesenheit von 0,05 µM PhoP~P und 0,04 µM

RNAP geschützt. Wurde die PhoP~P-Konzentration bei gleichbleibender RNAP-Konzentration erhöht, so wurde der Bereich -118 bis -67 schon bei 0,1 μ M PhoP~P wieder DNaseI-sensitiv. Der Bereich von +2 bis +44 wurde mit steigender PhoP~P-Menge stärker verdaut und der von -59 bis -8 glich mehr dem Bandenmuster von PhoP~P allein (Abbildung 2.23 A). Allerdings waren in Gegenwart beider Proteine die Basen zwischen -34 und -21 nicht hypersensitiv.

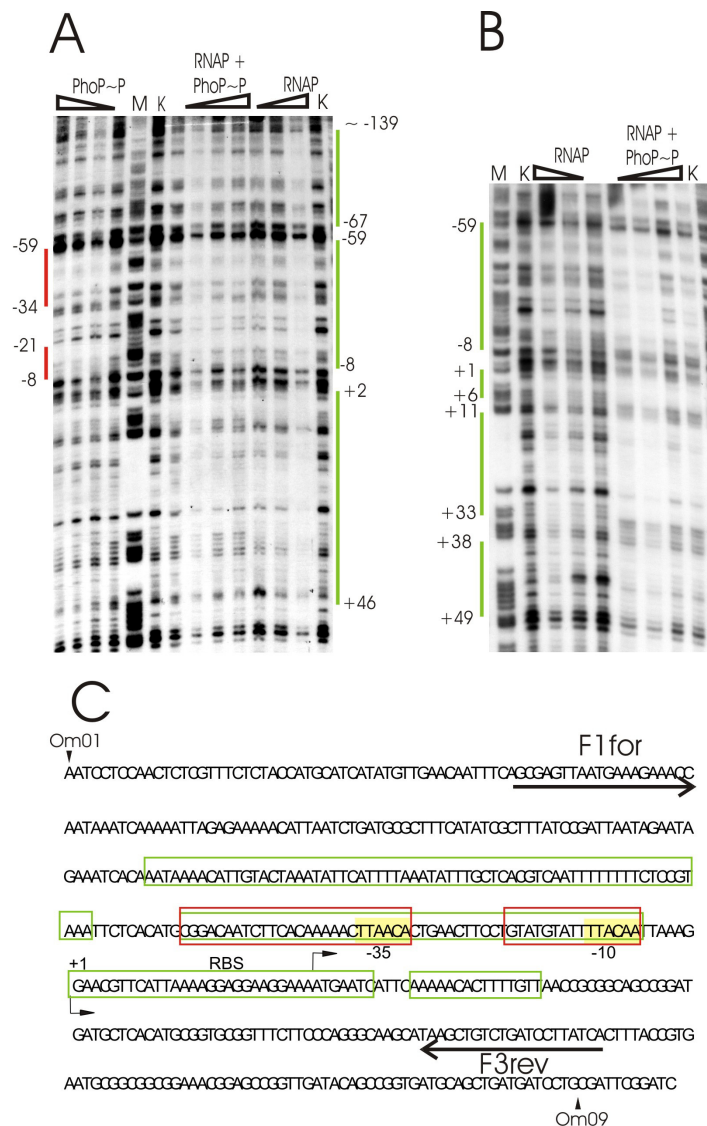


Abbildung 2.23: Footprint-Analyse des *phyC*-Promotors gebunden von PhoP~P und RNA-Polymerase; (A) PhoP~P wurde in den Konzentrationen von 0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M und 1,0 μ M und RNAP in 0,04 μ M, 0,08 μ M und 0,1 μ M verwendet. Rot markiert wurden die PhoP-Bindungsstellen; (B) RNAP wurde den Konzentrationen 0, 0,02 μ M, 0,04 μ M und 0,08 μ M verwendet und PhoP~P wie unter (A). beschrieben. Die grünen Linien zeigen geschützte Regionen in Anwesenheit von RNAP; M= A+G-Sequenzierungsreaktion, K-Proteinfreie DNA-Probe.

Diese Footprints lassen sich nur schwer deuten, da die Bindung der RNA-Polymerase sehr schwach war. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die RNAP mit nur geringer Affinität an den *phyC*-Promotor bindet, oder dass die

Bindungsbedingungen nicht optimal für die RNAP waren. Möglicherweise wäre hierbei die Initiation eines offenen DNA-RNAP-Komplexes günstiger gewesen. Diesen kann man durch Zugabe von Nukleotiden oder durch Inkubation bei 37 °C erreichen. Die hier gezeigten Footprints wurden bei RT durchgeführt, dies fördert eher den geschlossenen Komplex, dieser ist nicht so stabil, wie der offene Komplex.

PhoP-Interaktion mit mutagenisierten Promotorstrukturen

Die *phyC*-Promotorbereiche von -104 bis +41 aus den Plasmiden pMUT37 und pMUT13 wurden mit dem ³²P-F2for Primer markiert (F2for/F2rev-Fragmente). Das Plasmid pMUT37 enthielt die Transition A:G an der -37 Position und pMUT13 die Transversion T:G an -13. Die Footprints wurden nur mit PhoP~P durchgeführt.

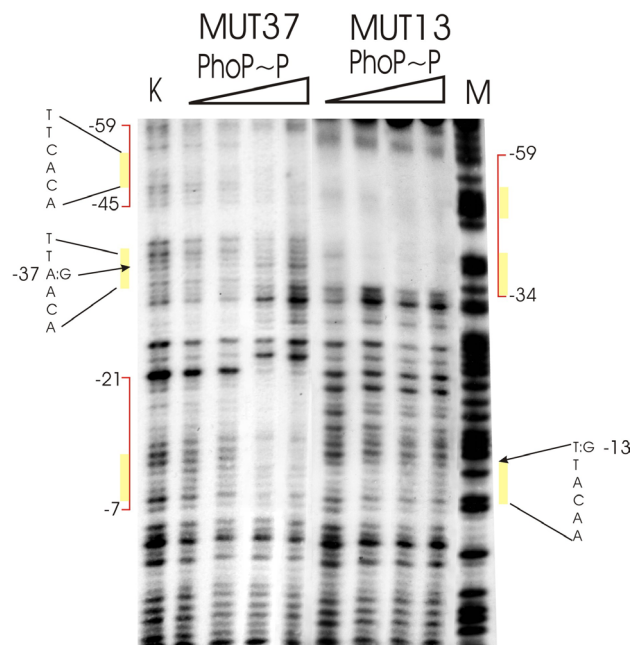


Abbildung 2.24: **Footprint-Analyse der mutagenisierten *phyC*-Promotoren gebunden mit PhoP~P;** MUT37 entspricht der Transition an der -37-Stelle (A:G) und MUT13 der Transversion an -13 (T:G). PhoP~P wurde in den Konzentrationen von 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM und 1,0 µM verwendet. Gelb markiert sind die PhoP-Bindungsstellen, mit roten Linien sind die PhoP~P-geschützten Regionen dargestellt, die Pfeile zeigen die mutagenisierten Basen; M= A+G-Sequenzierungsreaktion, K-Proteinfreie DNA-Probe.

Nach der Basensubstitution an der -37 Stelle (MUT37), war die durch PhoP~P-geschützte Zone (-59 bis -45) kürzer als im *wt*-Promotor (-59 bis -34) (Abbildung 2.24). Die Mutation hat die PhoP-Box an der -35 Region verändert, so dass hier keine Bindung durch PhoP~P erfolgen konnte. Dies war insofern unerwartet, als dass PhoP~P in Dimerform an zwei Konsensuswiederholungen (PhoP-Boxen) bindet (Eder et

al., 1999). Damit sollte, nach dem Entfernen der PhoP-Box an der -35 Region, die Position -59 bis -45 wesentlich schlechter geschützt werden als beim *wt*-Promotor, was hier aber nicht der Fall war. Möglicherweise reicht eine konservierte PhoP-Box für die Bindung von PhoP~P doch aus. Bei dieser Mutation wurde der Bereich um die -10 Region (-21 bis -7), wo sich eine dritte PhoP-Box befindet, ebenfalls geschützt.

Der an der -13 Position mutagenisierte *phnC*-Promotor zeigte, wie bereits beim *wt*-Promotor beobachtet, einen Schutzbereich von -59 bis -34, wo die beiden ersten PhoP-Boxen liegen. Allerdings konnte keine geschützte Zone um die -10 Region mehr beobachtet werden. Durch die Transversion an der -13 Position wurde damit die PhoP-Box aufgelöst und das Protein konnte nicht an die DNA binden.

3 Diskussion

In dieser Arbeit konnten zwei Proteine identifiziert werden, die an der Regulation des *phyC*-Gens maßgeblich beteiligt sind: PhoP und AbrB. Dabei ist PhoP in diesem System der übergeordnete Aktivator, ohne dessen Einfluss keine *phyC*-Expression möglich ist. AbrB wirkt als ein Repressor zweiter Ordnung. Die Wirkung und die hypothetische Interaktion von AbrB mit dem *phyC*-Promotor soll zuerst diskutiert werden. Anschliessend soll die ungewöhnliche Wirkung von PhoP auf *phyC* vorgestellt und dessen Bindungsstellen im Promotor, sowie deren Funktionen diskutiert werden.

3.1 Wie interagiert AbrB mit *phyC*?

AbrB reprimiert die *phyC*-Expression

Die hier erzielten Ergebnisse sprechen für eine hemmende Wirkung von AbrB auf den *phyC*-Promotor aus *B. amyloliquefaciens* FZB45. In den ersten, hier nicht dargestellten Versuchen in einem Low-Phosphat-Medium, das nicht durch TrisHCl gepuffert war, konnte gezeigt werden, dass die Reporteraktivität mit abfallendem pH-Wert ebenfalls gesunken ist. Wurde der pH-Wert auf 7,5 gebracht stieg die Reporteraktivität wieder (Abbildung 7.2). Da die AbrB-Konzentration bei niedrigen pH-Werten hoch und bei neutralen pH-Werten niedrig ist (Cosby und Zuber, 1997), war dies der erste Anhaltspunkt einer möglichen Wirkung von AbrB auf den *phyC*-Promotor.

Die Antagonisten AbrB und Spo0A kontrollieren den Übergang der Zelle in die stationäre Wachstumsphase, sowie später in die Sporulation. Während des exponentiellen Wachstums ist die AbrB-Konzentration hoch. AbrB kann hier die Menge an Spo0A niedrig halten, indem es die Expression von σ^H hemmt (Weir et al., 1991), somit ist nur der σ^A -abhängige *spo0A*-Promotor aktiv (Chibazakura et al., 1991, Predich et al., 1992). Während der transienten Phase wird Spo0A phosphoryliert. In seiner phosphorylierten Form besitzt Spo0A~P eine höhere Affinität zum *abrB*-Promotor und kann diesen effizienter hemmen (Strauch et al., 1990). Dadurch sinkt die Konzentration von AbrB beim Übergang in die stationäre Phase und die Gene, die durch AbrB reprimiert wurden, können exprimiert werden. Eine *spo0A*-Mutation bewirkt damit die Überexpression von AbrB, diese kann durch gleichzeitige *abrB*-Mutation teilweise ausgeglichen werden (Strauch, 1993).

Die durchgeführten Versuche mit den *abrB*-, *spo0A* und *abrBspo0A*-Mutanten zeigen deutlich, dass die *phyC*-Expression durch AbrB gehemmt wird (Abbildung 2.8).

Das AbrB-Protein war zudem im Stande das Laufverhalten des 511 bp langen *phyC*-Fragments in der Gelretardationsanalyse zu verzögern (Abbildung 2.18). Damit konnte gezeigt werden, dass AbrB an den *phyC*-Promotor bindet. Leider lässt sich an Hand der Sequenz keine genauere Vorhersage über die Bindungsstellen treffen, da das Protein kein konserviertes Sequenzmotiv zu erkennen scheint. Vielmehr wird angenommen, dass es eine dreidimensionale DNA-Struktur erkennt (Xu und Strauch, 1996). Die reprimierende Wirkung von AbrB konnte auch in der *in vitro* Transkription bestätigt werden (Abbildung 2.20). Da die hemmende Wirkung erst bei recht hohen Konzentrationen von AbrB zu beobachten war, könnte es darauf deuten, dass AbrB mit eher niedriger Affinität bindet. Aus den Experimenten mit verkürzten Promotorfragmenten konnten die *phyC*-Promotorbereiche, an welche AbrB bindet, eingegrenzt werden. Dabei müssen die Bindungsstellen unterhalb von +29 und oberhalb von -147 liegen (Abbildung 2.14). Da die *phyC*-Expression nach dem Entfernen des Bereiches bis +29 wesentlich stärker war als nach Verkürzung bei -147, kann man zusätzlich schlussfolgern, dass die Repressorwirkung an der ‚downstream‘-Region stärker ausgeprägt sein muss, als an der ‚upstream‘-Region und dass beide kumulativ sind.

Modell der Repression durch AbrB: eine Wechselwirkung mit benachbartem *yodU*-Gen?

Einen interessanten Aspekt lieferten die Expressionsversuche mit hoher Glukosekonzentration und der *ccpA*-Mutante. Obwohl das Phytasegen keiner Katabolitrepression unterliegt, hat CcpA einen positiven Effekt auf deren Expression (Abbildung 2.4 und Abbildung 2.7). Vielleicht liegt die Erklärung in der näheren Umgebung des *phyC*-Promotors. Da das Genprodukt des ‚upstream‘ liegenden, divergenten Gens *yodU* Homologie zur UDP-Glukoseepimerase zeigt, ist es wahrscheinlich am C-Katabolismus beteiligt, und könnte damit einer negativen Kontrolle durch CcpA unterliegen. Tatsächlich befindet sich zwischen -185 und -168 auf dem nicht-kodierenden Strang ein mögliches zum *phyC* divergentes *cre* (siehe Anhang 7.3). Fisher und Mitarbeiter haben einen Zusammenhang zwischen AbrB und den Genen für alternative C-Quellen gefunden. Sie haben festgestellt, dass viele Gene die der Katabolitrepression unterliegen durch AbrB positiv stimuliert werden. Für zwei der Gene wurde eine kompetetive Wirkung durch AbrB beschrieben, indem es um die gleiche Bindungsstelle wie CcpA konkurriert (Fischer et al., 1994, Strauch, 1995). Es

wäre möglich, dass *yodU* in der gleichen Weise durch CcpA und AbrB reguliert wird. Es wäre damit auch vorstellbar, dass sich die ‚upstream‘-liegende Bindungsstelle auf beide Gene auswirkt. An dieser Stelle könnte AbrB das CcpA verdrängen und dadurch *yodU* aktivieren, gleichzeitig aber *phyC* hemmen (Abbildung 3.1 A). Bei hohem Glukoseangebot sinkt die AbrB-Konzentration (Cosby und Zuber, 1997) und CcpA wird aktiviert, dadurch wird *yodU* reprimiert und die hemmende Wirkung von AbrB auf *phyC* schwächer (Abbildung 3.1 B). Andererseits scheint AbrB *phyC* durch Bindung an die Region unterhalb von +29 ebenfalls zu hemmen. Hier stellt sich die Frage, ob beide Bindemotive miteinander in Wechselwirkung stehen? Binden Dimere oder Tetramere oder sogar beide Formen von AbrB an *phyC*?

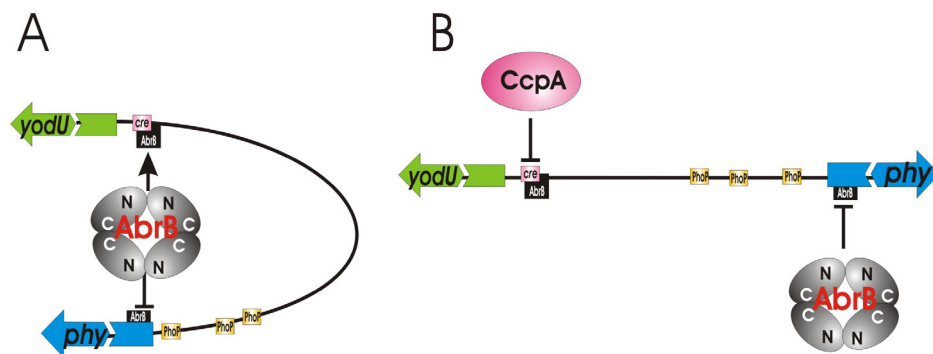


Abbildung 3.1: Ein mögliches Modell der Interaktion von AbrB mit *phyC*; (A) AbrB wirkt als Repressor auf *phyC* und als Aktivator auf *yodU*, dabei bindet ein Tetramer an beide Erkennungssequenzen und beugt dabei die DNA. (B) In Anwesenheit des *yodU*-Aktivators CcpA wird die Bindung von AbrB gestört und es kommt nur zur Hemmung von *phyC* durch die Bindung an die ‚downstream‘-liegende Erkennungssequenz.

Das AbrB bindet z. B. an den *sinIR*-Promotor nur als Tetramer, an den *spo0E* kann auch ein Dimer binden (Benson *et al.*, 2002, Vaughn *et al.*, 2000). Wirken auf den *phyC*-Promotor zwei verschiedene AbrB-Multimere durch separate Bindung an die beiden Regionen oder handelt es sich um ein Multimer, das beide Bereiche, die immerhin ca. 180 bp entfernt voneinander liegen, gleichzeitig bindet? AbrB bindet in den meisten AbrB-reprimierten Promotoren innerhalb der Initiationsregion und verhindert so die Interaktion der RNAP mit dem Promotor (Strauch, 1999). Könnte AbrB *phyC* ähnlich dem CAP aus *E. coli* beugen? Es ist bekannt, dass die N-terminale Domäne von AbrB (AbrBN53), die DNA-bindende Domäne darstellt (Furbass und Marahiel, 1991, Xu *et al.*, 2001). Die Dimerisierung erfolgt aber sowohl über die N- als auch die C-terminalen Domänen (Fude und Strauch, 2005), deshalb wird ein Modell des AbrB-Tetramers vorgeschlagen in dem zwei, durch N-Termini assoziierte Dimere über die C-Termini das Tetramer bilden (Abbildung 3.1) (Cavanagh *et al.*, 2002).

Dadurch entstehen zwei gegenüber liegende DNA-Bindungsgebiete die zwei verschiedene Stellen an der DNA erkennen könnten (Abbildung 3.1 D). Es gibt ein weiteres Indiz für eine mögliche Schleifenbildung. Die hemmende Wirkung von AbrB konnte in der *in vitro* Transkription nur dann beobachtet werden, wenn AbrB vor PhoP und RNAP mit der DNA inkubiert wurde. Wurde die Reihenfolge umgedreht, konnte keine Hemmung mehr beobachtet werden. Scheinbar behindert die PhoP-vermittelte Bindung der RNA-Polymerase sterisch die AbrB-Interaktion an dem Promotor. Es wurde zwar noch kein solches Beispiel der AbrB-Wirkung beschrieben, aber es wurden auch nur wenige AbrB-abhängige Promotoren so detailliert untersucht, wie *sinIR*, *comK* oder *spoOE*. Um dieses Verhalten genauer zu analysieren und um die störende Wirkung von PhoP zu umgehen, würden sich *in vitro* Transkriptions-Assays mit einem konstitutiven *phyC*-Promotor, wie aus der Mutante DEL13 anbieten.

Das oben vorgeschlagene Modell ist natürlich rein spekulativ. Die Bindungsmotive im *phyC* für AbrB wurden bislang nicht eindeutig identifiziert. Dies sollte die nächste Aufgabe sein. Dazu eignet sich die Footprinttechnik besonders gut. Hierbei könnten gleichzeitig die vermeintlichen Bindemotive beider Gene untersucht werden. Möglicherweise handelt es sich sogar um mehrerer Bindestellen in beiden Bereichen. Es wäre auch denkbar, dass diese separat AbrB binden und sich eine gebeugte DNA-Struktur gar nicht ausbildet. Hierzu würden vielleicht Gelretardationsexperimente mit den verkürzten Promotoren aufschlussreich sein. Falls die AbrB-Bindung keine Schleifenstruktur zu Folge hat, sollten die verkürzten Fragmente die DNA ähnlich hoch shiften, wie der unverkürzte Promotor, andernfalls würde man ein ‚Supershift‘ erwarten.

Weiterhin sollte CcpA und Hpr kloniert und gereinigt werden, um in Footprint-Assays zu prüfen, ob das *cre* von *yodU* wirklich CcpA bindet und mit AbrB um die Bindungsstellen konkurriert. *In vitro* Transkriptions-Assays mit CcpA und AbrB könnten aufdecken, ob CcpA tatsächlich die AbrB-Hemmung aufhebt.

Wie wird *yodU* reguliert?

Es ist durchaus denkbar, dass sich zwei benachbarte, divergente Promotoren beeinflussen. Immerhin befinden sich beide kodierende Bereiche (vom ATG gesehen) in nur 329 bp Entfernung. Deshalb wäre es auch interessant, der Frage nachzugehen, wie der *yodU*-Promotor reguliert wird. Hierzu bietet sich das gleiche System, wie in dieser Arbeit schon beschrieben, an. Der Promotor müsste ins pDG286 kloniert und

unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, wie auch in verschiedenen Mutanten getestet werden.

3.2 Der *phyC*-Promotor

***phyC* besitzt einen untypischen σ^A -abhängigen Promotor**

Bacillus subtilis und seine Verwandten verfügen über eine Vielzahl von σ -Faktoren. Während des vegetativen Wachstums ist σ^A der Haupt-Sigmafaktor der Zelle, er bewerkstelligt die Expression der meisten Gene („housekeeping genes“). Seine Erkennungssequenz (TTGACA-17_{nt}-TATAAT) ist identisch mit der von σ^{70} aus *E. coli*. Nicht nur das: die mit σ^{70} assoziierte *E. coli* Polymerase ist im Stande σ^A -abhängige *B. subtilis* Promotoren zu transkribieren. Neben σ^H und σ^B sind drei weitere, weniger häufige Sigmafaktoren nachgewiesen worden: σ^C , dessen Funktion nicht geklärt ist und der nur in einer sehr geringen Konzentration in der Zelle vorliegt; σ^D ist vor allen an der Expression der Flagellinproteine beteiligt; σ^L , dessen Genprodukte für die Verwertung einiger Aminosäuren und Zucker zuständig sind; σ^B ist vor allen für die Stress induzierte Genexpression zuständig (Review von Haldenwang, 1995); σ^H hingegen ist an der Expression von Genen der transienten und der späten exponentiellen Phase (wie *spoOA* oder Kompetenzgene) aber auch des vegetativen Wachstums beteiligt.

Eine Promotorstruktur der σ^H -abhängigen Promotoren wurde 2002 von Britton und Mitarbeitern vorgeschlagen: (RXAGGAWWW(N)₁₁₋₁₂(RXXGAATWW) (Britton et al., 2002). Zwei Sequenzmotive, die entfernte Homologien zum σ^H -Konsensus aufweisen, liegen im *phyC*-Promotor von *B. amyloliquefaciens* FZB45 vor –123 (siehe Anhang). Es ist aber eher unwahrscheinlich, dass diese Motive funktionell sind, denn wäre es der Fall, so hätten die promotorverkürzten Mutanten OM445 und OM545 eher schlechtere Reporteraktivitäten, als der ungekürzte Promotor aufweisen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall, die Aktivitäten waren sogar höher (Abbildung 2.13). Wie bereits oben erwähnt, führen Stresssituationen zur Expression σ^B -abhängiger Genen. Solchen Stresssituation wurde auch der *phyC*-Promotor ausgesetzt, eine erhöhte Expression konnte jedoch nicht gezeigt werden. Im Gegenteil, die *phyC*-Expression ist sogar stark gefallen (Abbildung 2.5). Damit kann eine σ^B -abhängige Phytaseexpression ebenfalls ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente, konnte gezeigt werden, dass das Phytasegen von einem σ^A -abhängige Promotor exprimiert wird. Bei *in vitro*

Transkriptions-Assays wurde *phyC* erfolgreich mit der σ^{70} -gesättigten RNA-Polymerase aus *E. coli* (Daten nicht gezeigt) und der $E\sigma^A$ aus *B. subtilis* transkribiert. Der Transkriptionsstart wurde mit einem G bestimmt und befindet sich 27 Basenpaare vom Translationsstart entfernt. Der σ^A -abhängige Promotor weist eine nicht typische Struktur auf. Die -10 Region mit der Sequenz TACAAT befindet sich zwischen -7 bis -12 und die -35 Region zwischen -34 bis -39, damit weicht das Fenster mit 21 bp von dem Konsensus (17 bp) ab. Eine mögliche, ebenfalls dem σ^A -abhängigen -10-Konsensus ähnliche Sequenz (TATTTT) die zwischen -12 und -17 liegt, und damit ein Fenster von 17 bp aufweist, konnte in Versuchen mit Substitutionsmutanten widerlegt und die TACAAT-Sequenz als -10 Region bestätigt werden.

Neben der -10 und -35 Regionen werden zwei weitere Strukturen für bakterielle Promotoren beschrieben: die -16 Region und ein UP-Element. Die -16 Region liegt ca. zwischen -15 und -18 und besteht aus einer TRTG(n)-ähnlichen Sequenz (Voskuil et al., 1998). Sie ist vergleichbar mit der ‚extended‘ -10 Region bei *E. coli*. Allerdings kommen diese bei *E. coli* hauptsächlich in Promotoren vor, die keine konservierte -35 Region besitzen. Hier sind sie wichtig für die Promotorerkennung durch die RNA-Polymerase (Keilty und Rosenberg, 1987). Bei *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, dass Promotoren, die eine -16 Region aufweisen sogar recht stark konservierte -35 und -10 Regionen besitzen (Voskuil und Chambliss, 1998). Mutationen in der -16 Region führen zu niedrigeren Transkriptionsraten bis hin zum Totalausfall der Promotoraktivität. Einen Hinweis auf eine solche Region in dem *phyC*-Promotor lieferten die Basensubstitutionsversuche. Interessanterweise liegt hier ein Tandemmotiv TGTATGTA vor, das dem Konsensus ähnlich ist. Die Funktion dieses Motivs ist aber weiterhin unklar. Promotoren die eine -16 Region zeigen, besitzen eine konservierte ‚upstream‘-Region zwischen -54 und -40, die ähnlich dem UP-Element von *E. coli* ist. Sie besteht aus einer T_n und eine A_n Abfolge direkt vor der -35 Region. Dieses Motiv stellt die Erkennungssequenz für die α -Untereinheit der RNA-Polymerase dar. Es konnte gezeigt werden, dass ein konserviertes UP-Element eine fast 300-fache höhere Transkriptionsrate bewirken kann (Estrem et al., 1998). Im *phyC*-Promotor findet man zwar eine A_n Wiederholung vor -40 aber keine T_n Abfolge vor -50. Dies könnte eine Erklärung für die niedrigen Promotoraktivitäten in den Deletionsmutanten sein (Abbildung 2.16). Hier wurde versucht einen möglichst konservierten Promotor mit einer perfekten -35 Region, einem 17 bp Fenster und fehlender PhoP-Box an der -10 herzustellen. Auch wenn die *phyC*-Expression danach zwar konstitutiv, und damit auch bei hohen Phosphatkonzentrationen messbar war, waren die *phyC*-Aktivitäten

insgesamt nicht sehr hoch. Im Vergleich dazu waren die Aktivitäten des Wildtyp-Promotors unter Einfluss eines Aktivators (PhoP) wesentlich stärker. Das spricht dafür, dass ein starker konstitutiver Promotor doch mehr enthalten muss, als eine konservierte -35 Region und ein Fenster von 17 bp. Im Fall des Phytasegens könnte PhoP das fehlende UP-Element überbrücken und so die Transkription fördern.

Kann man einen starken konstitutiven *phyC*-Promotor erzeugen?

Für industrielle Anwendungen wäre es interessant die Phytase in einem natürlichen, nicht induzierbaren System in größeren Mengen zu exprimieren. In Überexpressionssystemen, wo *E. coli* als Wirt dient, wird die Phytasegewinnung durch mehrere Faktoren erschwert. Die Zellen müssen geerntet werden. Bei Verwendung eines Systems mit einem *E. coli* Signalpeptid wird das Enzym dann aus dem Periplasma isoliert, ansonsten muss es aus dem Cytosol gereinigt werden. *Bacillus* hingegen sekretiert Phytase direkt ins Medium. Das bietet die Möglichkeit einer kontinuierlichen Produktion. Durch Klonierung des Gens in einen probiotischen Stamm, könnte man diesen direkt in der Tierernährung einsetzen. Dafür müsste aber der *phyC*-Promotor wesentlich stärker exprimiert werden, als im Wildtyp. In dieser Arbeit konnte ein konstitutiver *phyC*-Promotor hergestellt werden, der bereits 5-fach höhere Expression aufweist. Um die Expression weiter zu steigern, sollten die nächsten Veränderungen des Promotors, auf die Generation eines UP-Elementes zielen. Es konnten gezeigt werden, dass ein künstliches UP-Element mit der Sequenz -59 5'-GGAAAATTTTTTAAAAAAGA-3' -38 die Transkriptionsrate bis zur 340-fach verstärkt (Estrem *et al.*, 1999). Bei *phyC* befindet sich direkt hinter -40 eine Abfolge von A₆, die scheinbar nicht ausreichend für die optimale Aktivierung ist. Möglicherweise könnte eine Insertion von einigen Thyminbasen die Promotorstärke erhöhen.

3.3 Wie wird *phyC* durch PhoP aktiviert?

Phytase ist Teil des Pho-Regulons

In den ersten Versuchen, konnte gezeigt werden, dass *phyC* aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 nur unter Phosphatmangel exprimiert wurde. Phosphatmangel induziert bei *Bacillus subtilis* zum einen das spezifische Pho-Regulon, zum anderen die σ^B -abhängige Stress-Antwort. Wie bereits oben beschrieben, ist das

Phytasegen nicht σ^B -abhängig, damit war es wahrscheinlich, dass es Teil des Pho-Regulons ist. Die beiden Schlüsselproteine des Pho-Regulons sind der Responseregulator PhoP und die Histidinkinase PhoR. Dieses Zwei-Komponenten-System setzt in der Zelle Prozesse in Gang, die für eine effizientere Nutzung des Phosphors notwendig sind. Die Targets des PhoP sind unter anderen Gene für Enzyme, die Phosphate aus organischen Verbindungen hydrolysieren und für den Zellstoffwechsel wieder verfügbar machen, wie für die zwei alkalischen Phosphatasen, *phoA* und *phoB* (Bookstein *et al.*, 1990, Hulett *et al.*, 1994, Chesnut *et al.*, 1991, Hulett *et al.*, 1991), sowie für die Phosphordiesterasen *phoD* (Eder *et al.*, 1996) und *glpQ* (Antelmann *et al.*, 2000). Auch das hochaffine Phosphattransportsystem (*pstS*) wird aktiviert (Qi *et al.*, 1997), um das freie Phosphat effizient in die Zelle zu bringen. Die Phytase spaltet ebenfalls Phosphatgruppen von Phytat ab. Im Fall von *B. amyloliquefaciens*, werden so insgesamt drei Mol Phosphat aus 1 Mol Phytat freigesetzt. Expressionsversuche in einer *phoP*-negativen Mutante zeigten einen Totalausfall der Reporteraktivitäten (Abbildung 2.6). Daraus kann man schließen, dass PhoP die *phyC*-Expression aktiviert. In Gelretardationsanalysen konnte zudem die Bindung von phosphoryliertem PhoP (PhoP~P) an den *phyC*-Promotor nachgewiesen werden (Abbildung 2.17), damit gehört *phyC* zum Pho-Regulon.

Ein Verbindung zum Inositolstoffwechsel konnte nicht bestätigt werden. Die Expression der Gene, die für den Inositolabbau zuständig sind, wird durch den *IoIR*-Repressor kontrolliert. In Anwesenheit von Inositol wird die Repressorwirkung von *IoIR* unterdrückt und das *iol*-Operon wird exprimiert (Yoshida *et al.*, 1999). Auch wenn die Möglichkeit besteht, dass der weitere, noch nicht bekannte Abbau von Inositoltrisphosphat, dem Produkt der Phytase, in den Inositolstoffwechsel mündet, induziert die Anwesenheit von Inositol (als einzige C- Quelle) nicht die *phyC*-Expression. Damit ist es unwahrscheinlich, dass ein Zusammenhang zwischen der *phyC*-Expression und der Expression des *iol*-Operons besteht.

PhoP hat eine duale Rolle in der *phyC*-Regulation

An Hand der bis jetzt untersuchten Pho-Regulon-Gene wurde von Hulett und Mitarbeitern ein Modell der PhoP~P Interaktion vorgeschlagen. Demnach aktiviert PhoP~P die Expression durch Bindung an hochaffine ‚upstream‘ Stellen, die aus mindestens vier TT(A/T/C)ACA Wiederholungen bestehen, diese sind durch weniger als 11 Basenpaare von einander getrennt (Liu and Hulett, 1997, Liu *et al.* 1998a). Dabei

bindet jeweils ein PhoP~P-Dimer (Eder *et al.*, 1999) an eine Tandemsequenz. Um zu klären, wo PhoP in dem *phyC*-Promotor bindet, wurden zum einen Experimente mit verkürzten sowie mutagenisierten Promotoren, zum anderen DNaseI-Footprints durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsstellen innerhalb der Positionen -77 und +29 befinden (Abbildung 2.22). In den Footprint-Experimenten konnten zwei PhoP-Bindungsstellen zwischen -34 und -50 identifiziert werden, die durch 5 bp getrennt sind. Weitere Bindungsmotive, sowohl ‚upstream‘ als auch ‚downstream‘ von diesem Tandem, die sich in einer Entfernung unter 11 bp befinden sollten, wurden nicht gefunden. Dafür aber ein Motiv, das die -10 Region um eine Base überlagerte und damit bei -8 bis -13 lag. Die PhoP~P-Bindung an dieser Region wies eine Schutzzone von -8 bis -21 auf. Durch die Bindung eines PhoP~P-Dimeres an diese Stelle, wurde vielleicht ein etwas größerer Bereich vor dem DNaseI-Verdau geschützt, auch wenn oberhalb von -13 keine PhoP-Box existiert. Alle drei Motive zeigten starke Ähnlichkeit mit dem Konsensus TT(A/T/C)ACA. Eine vierte Sequenz zwischen der ersten (bei -10) und zweiten (bei -35) PhoP-Box konnte nicht identifiziert werden. Eine Basensubstitution (T:A) an der einzigen möglichen Stelle (-27), an der sich das vierte Motiv (TTCCTG) hätte befinden können, zeigte 169 % der Reporteraktivität und in Footprint-Experimenten wurde dieses Motiv als hypersensitive und damit exponierte und nicht geschützte Stelle sichtbar. Dies schließt die Möglichkeit einer PhoP-Box an dieser Stelle aus. Basensubstitutionen in den beiden PhoP-Boxen bei -35 bewiesen, dass diese essentiell für die *phyC*-Expression sind. Die Basensubstitutionen A:G bei -35, sowie A:G bei -35 und A:G bei -47, führte zum Totalausfall der Promotoraktivität, obwohl damit der Konsensus für die RNA-Polymerase geschaffen wurde. Wurde hingegen nur die ‚upstream‘-liegende PhoP-Box mutagenisiert (-44 bis -50), sank die *phyC*-Expression auf 17 %, fiel aber nicht vollständig aus (Abbildung 2.15). Bei den Deletionsmutanten wurde ebenfalls sichtbar, dass diese PhoP-Boxen für die *phyC*-Expression wichtig sind. Denn obwohl der Promotor durch die Verkürzung der Entfernung zwischen -10 und -35 auf 17 Basenpaare, nun dem Konsensus näher kam, war die Expression besser wenn die PhoP-Boxen intakt waren (DEL13). Hier war sogar nur eine PhoP-Bindungsstelle, die zwischen -44 und -50 (DEL37), immer noch vorteilhafter als wenn beide fehlten (DEL3747), auch wenn der *phyC*-Promotor dann dem Konsensus der RNAP sehr nahe kam.

PhoP ist nicht nur ein Transkriptionsaktivator für Gene, die der Phosphatmobilisierung dienen, es hemmt zum Beispiel die Gene der

Teichonsäuresynthese, *tagAB* und *tagDEF* (Liu et al., 1998), damit soll der Phosphatverbrauch der Zelle unter Phosphatmangel niedrig gehalten werden. Für Promotoren, die durch PhoP~P gehemmt werden, wurde beobachtet, dass sie nur zwei Erkennungsstellen besitzen, an die ein PhoP~P-Dimer bindet (Liu et al., 1998b). Ein interessantes Beispiel für eine duale Rolle von PhoP bei der Expression von *phoB* wurde 2005 vorgestellt (Abdel-Fattah et al., 2005). Während des vegetativen Wachstums unter Phosphatmangel, wird die *phoB*-Expression durch die Bindung von PhoP an den σ^A -abhängigen Promotor aktiviert. Bindet PhoP an den σ^E -abhängigen Promoter, der während des 2. Sporulationsstadiums aktiv ist, kommt es zur Repression. In den hier durchgeführten Gel-Shift-Experimenten konnte nicht nur gezeigt werden, dass PhoP~P dem *phyC*-Promotor bindet, sondern darüber hinaus die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor fördert, allerdings nur bei niedrigen Konzentrationen von PhoP~P. Bei höheren PhoP~P-Konzentrationen wurde die RNAP wieder verdrängt (Abbildung 2.17). Dieses Verhalten wurde in der *in vitro* Transkription bestätigt. Die Transkriptmenge stieg anfänglich mit höherer PhoP~P-Konzentration und fiel dann auf ein konstantes Level, wurde die PhoP~P-Menge weiter erhöht. Diese hemmende Wirkung konnte auf die Bindung von PhoP~P an der -10 Region zurückgeführt werden, denn die *in vitro* Transkription des MUT13 Promotors, der eine Transversion an -13 und damit keine PhoP-Box mehr besaß, zeigte dieses Verhalten nicht mehr (Abbildung 2.19). Der Footprint dieser Mutante wies keine Bindung von PhoP~P an die -10 Region auf (Abbildung 2.24). Diese Mutante zeigt 6 mal höhere Promotoraktivitäten in Low-Phosphat-Medium (LPM) als der Wildtyp. Interessanterweise war die Reporteraktivität im High-Phosphat-Medium (HPM) auch 1,5 Fach höher als im Wildtyp unter Phosphatmangel (LPM) (Abbildung 2.15). Während der Phosphatsättigung ist die PhoP-Konzentration sehr niedrig (Puri-Taneja et al., 2006), allerdings schien die Bindung von den wenigen PhoP-Molekülen ausreichend zu sein, um den *phyC*-Promotor zu aktivieren, wenn die PhoP-Box an der -10 Region nicht vorhanden war. Damit konnte gezeigt werden, dass *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* nicht nur Teil des Pho-Regulons, sondern auch der erste σ^A -abhängige Promotor ist, der einer dualen Kontrolle durch PhoP~P unterliegt. Denn der Responseregulator wirkt hier als Aktivator durch Bindung an die PhoP-Boxen bei -34/-39 und -45/-50 und als Repressor durch Bindung an die Box bei -13/-8. Diese Strukturen weichen von den beschriebenen Pho-Regulon-Genen ab, denn die Aktivierung erfolgt nicht über vier, sondern über zwei Erkennungsstellen und die Repression über eine, statt über zwei.

Modell der Aktivierung des *phyC*-Promotors durch PhoP~P

Der *phyC*-Promotor aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 weist starke strukturelle Ähnlichkeiten zum *spoIIG*-Promotor aus *B. subtilis* auf (Kumar et al., 2004). Beide besitzen recht stark konservierte -35 und -10 Bereiche mit einem Fenster von 21 bp bzw. 22 bp. Beide werden nur in Anwesenheit eines phosphorylierten Transkriptionsaktivators, PhoP~P bzw. Spo0A~P, transkribiert. Beide Proteine binden als Dimere an eine Tandemsequenz auf dem nicht kodierenden Strang, bestehend aus ca. 6 Basenpaaren, die durch wenige Basenpaare getrennt sind. Bei beiden Proteinen befindet sich eine Erkennungsstelle an der -35 Region und die andere ‚upstream‘ davon. Die Abhängigkeit des *spoIIG* von Spo0A~P wird auf das vergrößerte Fenster zwischen -35 und -10 zurückgeführt. Moran und Mitarbeitern schlagen für die Aktivierung des *spoIIG*-Promotors eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Spo0A~P und der σ^A -assoziierten RNA-Polymerase ($E\sigma^A$) (Kumar et al., 2004). Entsprechend dieses Modells ist es eher unwahrscheinlich, dass beide Proteine zur selben Zeit die selbe Bindungsstelle besetzten. Vielmehr wird angenommen, dass die Bindung der RNAP an der -10 Region durch Spo0A~P gefördert wird, indem es selbst an der -35 Region bindet und damit das $E\sigma^A$ ‚downstream‘ schiebt. Dabei verankert Spo0A~P das $E\sigma^A$ an der -35 Region. Ein weiterer Spo0A-abhängiger Promotor, *spoIIIE*, weist ähnliche Strukturen wie *spoIIG* auf (Guzman et al., 1988). Hier ist das Fenster 21 bp groß und die Spo0A-Box überlagert ebenfalls die -35 Region (York et al., 1992). Ausgehend von den aufgeführten Ähnlichkeiten, die auch bei dem *phyC*-Promotor vorzufinden sind, ist es nicht abwegig davon auszugehen, dass auch die Aktivierung durch PhoP~P den gleichem Prinzip, wie bei Spo0A~P folgt. Die -35-Region ist die ‚Recognition site‘ für die RNAP, damit erfolgt der erste Kontakt zwischen der RNAP und Promotor hier. Die σ^A -assoziierte RNAP ($E\sigma^A$) erkennt die -35 Region und bindet daran, kann aber durch die zu große Entfernung nicht an -10 binden (Abbildung 3.2 A). Durch die Bindung von PhoP~P an die -35 Region und an $E\sigma^A$, wird die RNAP ‚downstream‘ vorgeschoben und die Entfernung zur -10 überbrückt (Abbildung 3.2 B).

Durch die Bindung von PhoP~P an die -10 Region wird die RNA-Polymerase wahrscheinlich sterisch an der Transkription gestört und möglicherweise dissoziiert sie sogar von der DNA (Abbildung 3.2 C). Darauf deutete in Gelretardationsexperimenten die Tatsache, dass der DNA-Protein-Komplex in Gegenwart von RNAP und einer niedrigen PhoP~P-Konzentration zum Supershift führte, dann aber mit steigender PhoP~P-Konzentration erst kleiner wurde und später dem Komplex mit nur PhoP~P entsprach (Abbildung 2.17). Auch der Footprint mit

RNAP und PhoP~P zeigte eine ausgeprägte geschützte Zone (> -118 bis 43) bei niedriger PhoP~P-Konzentration, die wesentlich kleiner wurde und immer mehr den Bandenmuster der PhoP~P Bindung entsprach (Abbildung 2.23), stieg die PhoP~P-Konzentration weiter an. Dieses Verhalten sollte aber genauer untersucht werden. Hierzu könnten Experimente in der BIACORE aufschlussreich sein. Dazu müsste an ein Chip gebunden Promotor-DNA mit den Proteinen bestückt werden. Da bei dieser Methode die Änderungen in der Lichtbrechung detektiert werden, könnte man so feststellen, ob die RNAP bei einer bestimmten PhoP~P-Konzentration den Komplex verlässt oder nicht.

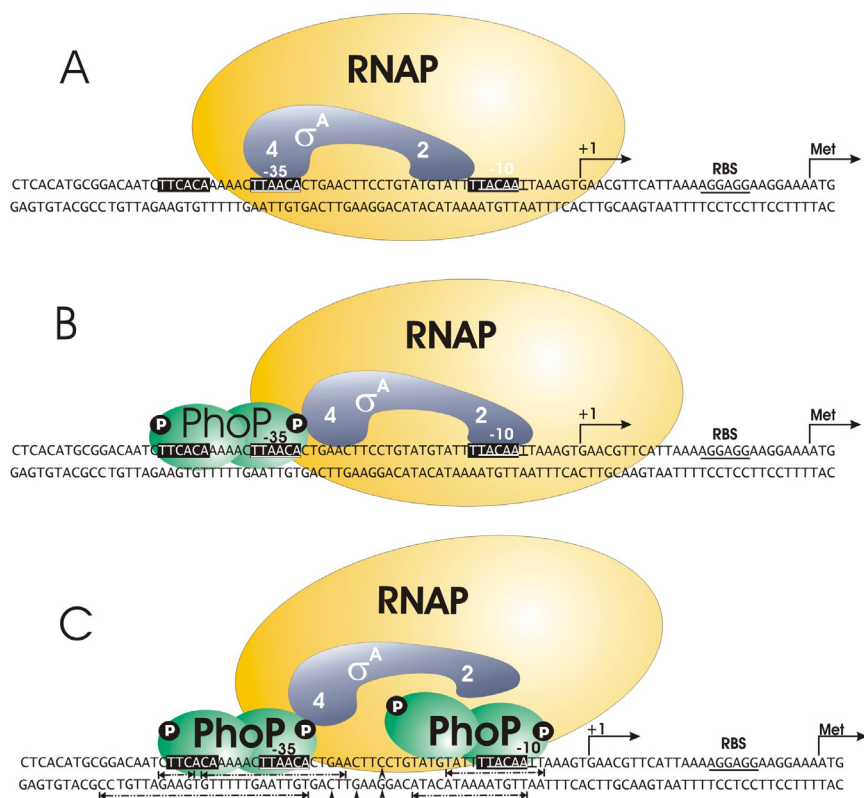


Abbildung 3.2: **Modell der Wechselwirkung von RNAP und PhoP~P mit dem *phyC*-Promotor;** (A) Die RNA-Polymerase bindet zu erst die -35 Region, kann aber die Transkription nicht beginnen, da sie die 21 bp entfernte -10 Region nicht erreicht; (B) Durch die Bindung von PhoP~P an die PhoP-Boxen, welche die -35 und die darüber liegende Sequenz (-44 bis -50) bedeckten, wird die RNAP um 4 Basenpaare vorgeschoben und kann nun die -10 Region binden: die Transkription findet statt; (C) Bei höheren Konzentrationen kann PhoP~P an die PhoP-Box ähnliche Bindungsstelle an der -10 Region binden und verhindert so die Transkription von *phyC*. Der Transkriptionsstart (+1) und Translationsstart (Met) sind mit Pfeilen gekennzeichnet, unterhalb der Sequenz (C) sind die durch PhoP~P vor DNaseI-Verdau geschützten Bereiche mit unterbrochenen Pfeilen und die hypersensitiven Stellen durch Pfeilköpfe dargestellt.

Wie interagieren PhoP und RNAP miteinander?

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt vor allem bei der Erforschung der PhoP- und RNAP-Bindung an den Promotor. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der RNA-Polymerase an den *phyC*-Promotor stets von PhoP~P abhängig ist. Wie interagieren aber diese Proteine miteinander? Beruht die Interaktion nur auf Protein-Protein-Wechselwirkungen oder ist die Anwesenheit der DNA wichtig? Hierzu würde sich ein eher einfaches Experiment anbieten: Die einzelnen Komponenten (RNAP, PhoP~P und ³²P-DNA) müsste man miteinander in verschiedenen Kombinationen reagieren lassen. Da die hier verwendete RNA-Polymerase einen His-Tag an der β' -Untereinheit trägt, könnte man nun über eine Ni-Agarose-Reinigung diese wieder aus dem Reaktionsansatz angeln. Eine Analyse in der SDS-PAGE würde dann zeigen, ob mit der RNAP auch das PhoP~P und die DNA (z.B. radioaktiv markiert) eluiert werden konnten.

Hulett und Mitarbeiter hatten bereits 2004 Bereiche identifiziert die für die PhoP-RNAP und PhoP-DNA-Wechselwirkungen zuständig sein könnten (Chen *et al.*, 2004). Sie konnten zeigen, dass in der C-terminalen Transaktivatorodomäne Aminosäuren, die sich in der $\alpha 3$ -Helix und der benachbarten Schleife befinden, für diese Interaktionen zuständig sind (Abbildung 3.3). So zum Beispiel sind die Aminosäuren I₂₀₆, H₂₀₈, L₂₀₉, und R₂₁₀ für die DNA-Bindung zuständig (orange). PhoP-Varianten mit Alaninsubstitutionen an diesen Stellen wurden zwar phosphoryliert und dimerisierten auch, konnten aber nicht an die DNA binden. PhoP mit Mutationen in V₂₀₄ und H₂₀₅ (blau) wurde ebenfalls phosphoryliert und dimerisierten, aber konnten nur bei hohen Konzentrationen in phosphorylierter Form die DNA binden. Die Mutationen in V₂₀₂ und D₂₀₃ (grün) senkten die Phosphorylierungsrate von PhoP, auch wenn es zur Dimerbildung kam. Dieses mutagene PhoP konnte die DNA nicht binden. Interessant aber waren die Mutationen in der Schleife zwischen Helix $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Diese (rot) zeigten keine Defekte in der Phosphorylierung sowie in der DNA-Bindung, führten aber zum Ausfall der Transkription. Diese Aminosäuren sind Kandidaten für Interaktionen zwischen PhoP und RNA-Polymerase (Chen *et al.*, 2004).

Die Untersuchungen aus denen diese Aussagen hervorgingen, berührten auf *in vivo* Experimenten mit mutagenisierten PhoP und auf Gelretardationsanalysen sowie *in vitro* Transkriptionen. Eine detaillierte Aussage könnten hier Experimente mit Peptidbibliotheken liefern. Zum Beispiel könnten synthetische Peptide der Transaktivatorodomäne mit RNAP inkubiert und so die Bindungskonstanten ermittelt werden. Daraus ließe sich feststellen, welche der AS besonders wichtig für die Interaktion sind. Eine Untersuchung der Aminosäuren in der α -Untereinheit der RNA-

Polymerase, die an der PhoP-Bindung beteiligt sein könnten, wäre ebenfalls aufschlussreich. Da die RNAP auch mit anderen Regulatoren, wie Spo0A interagiert, stellt sich hier die Frage, ob die daran beteiligten Stellen in der RNAP stets die selben sind oder je nach Reaktionspartner variieren. Um diesen Fragen nachzugehen eignen sich ebenfalls Peptidbibliotheken, allerdings dann von der α -Untereinheit der RNAP, die man mit PhoP und anderen Regulatoren testen könnte.

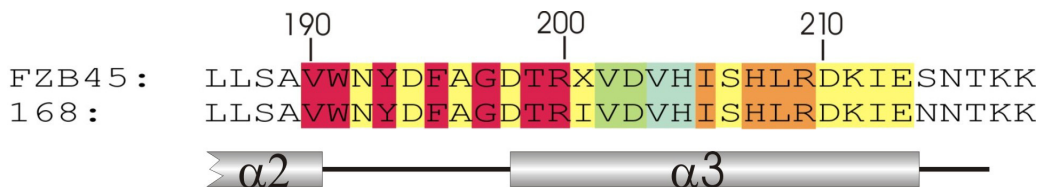


Abbildung 3.3: Vergleich der AS-Sequenz der C-terminalen Effektordomäne von PhoP aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* FZB45. Die AS-Positionen sind oben angegeben, unten sind die 2-D-Strukturen dargestellt. Der Bereich von 190 bis 214 (gelb) wurde in einer Alanin-Mutagenesestudie verwendet (Chen *et al.*, 2004). Die farbige Markierung ist im Text erklärt. Nur die Aminosäure an der Position 201 ($I_{168} \rightarrow X_{45}$) ist bei FZB45 noch nicht geklärt und erfordern eine weitere Sequenzierung. Die Position 215 ($N_{168} \rightarrow S_{45}$) weist eine andere AS auf. Da diese Stellen innerhalb der Domäne keine besondere Rolle zu spielen scheinen, dürften die Unterschiede nicht besonders ins Gewicht fallen

Weiterhin wäre es interessant zu erfahren, ob die RNAP durch die Bindung von PhoP an die -10 Region von der DNA abgelöst, oder nur an der Transkription gehindert wird. Auch die Reihenfolgen der Proteinbindung an den Promotor ist unklar. Bindet nun die RNAP oder PhoP zuerst an die -35 Region. Um diese Fragen zu klären eignet sich ebenfalls eine BIACORE-Analyse mit Chip-gebundener *phyC*-DNA..

3.4 Lässt sich das Modell der *phyC*-Regulation auf andere *Bacillus* Spezies erweitern?

In DNA ‚Microarray‘-Analysen des Pho-Regulons von *Bacillus subtilis* (Ogura *et al.*, 2001), wurde das Phytasegen nicht gefunden. Die Proteom- und Transkriptions-Analyse, der unter Phosphatmangel induzierten Proteine von *B. subtilis*, ergab ebenfalls keine Phytase (Antelmann *et al.*, 2000). In den Versuchen mit der OM21-Mutante, die eine Fusion zwischen *phyC* aus *B. subtilis* 168 und *lacZ* besaß, konnte unter Phosphatmangel auch keine Reporteraktivität gemessen werden (Abbildung 2.1). Dies kann auf den veränderten Promotorbereich bei dem Stamm zurückgeführt werden. Im Sequenzvergleichen mit anderen *Bacillus*-Vertretern (Anhang, 7.2.1) wird erkennbar, dass dieser Laborstamm, und damit wahrscheinlich alle seine Abkömmlinge, einen degenerierten *phyC*-Promotor besitzen, auch wenn die kodierende Sequenz stark konserviert blieb (Abbildung 7.8). Dies könnte ein Effekt der

vielen Generationen, die der Stamm unter unnatürlichen Laborbedingungen durchlebt hat. Da die Phytase scheinbar nicht zum lebensnotwendigen Proteinrepertoire der Zelle unter diesen Bedingungen gehört, degenerierte der *phyC*-Promotor.

Bei solchen wichtigen Proteinen wie PhoP, AbrB oder gar der RNAP kann man allerdings davon ausgehen, dass die Proteinsequenzen in verwandten Spezies recht stark konserviert sind. Die beiden PhoP-Proteine von *B. amyloliquefaciens* FZB45 und *B. subtilis* 168 unterscheiden sich zum Beispiel nicht sehr von einander (siehe auch Anhang 7.2.2). Wie der Abbildung 3.3 zu entnehmen ist, sind die Transaktivatordomänen fast identisch. Die Helices und die β -Faltblattstrukturen sind insgesamt sehr konserviert, nur der Linker zwischen den beiden Domänen, der keine bekannte Funktion hat, zeigt weniger Homologie (Anhang, Abbildung 7.12). Auch der Promotor von *phyC* scheint unter freilebenden *Bacillus*-Spezies konserviert zu sein. Der Grund, dass dies nicht für *B. subtilis* 168 gilt, wurde bereits oben erwähnt. In dem *B. subtilis* Stamm AF029053 (VTT E-68013), der dem Wildtyp eher entspricht, ist der *phyC*-Promotor wiederum sehr ähnlich denen von *B. amyloliquefaciens*.

Aus dem Sequenzvergleich der *phyC*-Gene verschiedener *Bacillus*-Vertreter (Anhang 7.2.1), lässt sich sagen, dass die Regulation über PhoP, sowohl die positive als auch die negative, in *B. subtilis* und in *B. amyloliquefaciens* identisch sein dürfte, denn die PhoP-Boxen kommen in allen Spezies vor. Bei *B. licheniformis* liegen zwei PhoP-ähnliche Motive 62 bp von ATG entfernt. Diese könnten die für Aktivierung des *phyL* zuständig sein. Hier fehlt aber das dritte Motiv in der Nähe von -10, was bedeuten könnte, dass PhoP diesen Promotor nicht zusätzlich hemmt. Die Repression durch AbrB lässt sich schon schwerer auf die anderen Bacillen übertragen. Vor allem ist die Hemmung über die ‚upstream‘ liegende Sequenz nicht klar. Die *B. amyloliquefaciens* Stämme FZB42, FZB45 und DS11 zeigen hier fast identische Sequenzbereiche, Stamm AF453255 weicht hier etwas mehr ab. Leider fehlen die Sequenzdaten von dem *B. subtilis* Stamm AF029053 an dieser Stelle und Stamm 168 ist aus dem oben genannten Grund nicht aussagekräftig für seine Spezies. Für *B. licheniformis* kann darüber auch keine Aussagen getroffen werden. Dieser Promotor unterscheidet sich stärker von den anderen. Allerdings zeigt er ein sehr konserviertes divergentes *cre* ‚upstream‘ des Promotors, das zwar nicht mit dem aus *B. amyloliquefaciens* identisch ist, aber sich ebenfalls auf das benachbarte Gen auswirken könnte. Da die Sequenzen unterhalb von +29 jedoch recht stark konserviert sind, könnte eine AbrB vermittelte Repression in diesem Bereich bei allen Spezies stattfinden.

Letztendlich kann man davon ausgehen, dass die Phytase in *Bacillus* Teil des Pho-Regulons ist und durch PhoP induziert wird. Die duale Funktion von PhoP mag sich vielleicht nur auf die Phytasegene aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* Vertretern beschränken. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass sich noch weitere Spezies finden werden, in denen die Phytase und vielleicht auch andere PhoP-abhängige Gene, durch PhoP in der selben Art und Weise reguliert werden, wie hier beschrieben.

4 Material

4.1 Nukleotide und Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 1: *phyC*-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Schnittstelle	Position zum Transkriptionsstart
Om01	ATGAATTCCTCCAACCTCTCGTTTCTCTACCATGC	<i>EcoRI</i>	-289 bis -257 -369 bis -336*
Om02	AATGGCAAGCTTATCTGCTGCATCATCGC	<i>HindIII</i>	+172 bis +200
Om08	CAATTAAAGTGAAGCTTCATTAAGGAGG	<i>HindIII</i>	-2 bis +19
Om09	ATTCTTGGGATCCAGCCAAATCG	<i>BamHI</i>	+199 bis +221
Om10	ATACTAGTCATATGAATCATTCAAAAACAC		+16 bis +45
Om13	GGTTGACCCGAGAAAACAGCC		+1138+ bis 1259
Om14	TGTTTTGAAGGATCCATTTTCCTTCTCTCC	<i>BamHI</i>	+14 bis +43
Om16	GGATCAGACAGCTTATGCTTGCCC		+101 bis +124
Om33	CGTACGGCTTAGACATTGCGGCTTGTGAGGCC		+1403 bis +1435 **
Cut1	TATGTATTTTAGAATTCAGTGAACG	<i>EcoRI</i>	-21 bis +5
Cut2	TTCACGAATTCCTTAACACTGAACTTCC	<i>EcoRI</i>	-50 bis -23
Cut3	TCTCCGTGAATTCACATGC	<i>EcoRI</i>	-81 bis -58
Cut4	TATTCATTTGAATTCCTTGTCTACG	<i>EcoRI</i>	-115 bis -90
Cut5	TCCGATTAATAGAATTCAAATCAC	<i>EcoRI</i>	-158 bis -135
F1for	GCGAGTTAATGAAAGAAACC		-234 bis -215
F1rev	GGAGAAAAAAATTGACGTGAGC		-97 bis -75
F2for	AATATTTGCTCAGTCAATTTTTTTCTCC		-104 bis -75
F2rev	GTGTTTTGAATGATTCATTTCTTCC		+13 bis +41
F3for	CCTGTATGTATTTACAATTAAGTGAACG		-25 bis +5
F3rev	GTGATAAGGATCAGACAGCTTATGC		+106 bis +131
Mut37for	CGGACAATCTTCACAAAACTTGACACTGAACTTC C		-58 bis -23
Mut49for	CGGACAATCTACACAAAACTTAACACTGAACTTC C		
Mut3747for	CGGACAATCTACACAAAACTTGACACTGAACTT CC		
Mut47for	ACAATCTTCGCAAAAACTTAACACTGAAC		-47 bis -27
MUT47rev	AGTGTTAAGTTTTGCGAAGATTGTCCG		
Mut27for	CACTGAACATCCTGTATGTATTTAC		-35 bis -10
MutF11	TTCCTGTATGTATTTGCAATTAAGTGAACG		-27 bis +4
Del1for	AACGTGTATGTATTTACAATTAAG		-30# bis -2
Del13for	CTTACACTGAACTGTATGTATTGTACAATTAAGT G		-40# bis +1
Del37for	CTTGCACTGAACTGTATGTATTTACAATTAAGT G		
Del1337for	CTTGCACTGAACTGTATGTATTGTACAATTAAGT G		

MATERIAL

Mut7for	CTTCCTGTATGTATTTTACAAGTAAAGTGAACG	-28 bis +5
Mut17for	CTTCCTGTATGCAATTTTACAATTAAAGTGAACG	
Mut13for	TGTATGTATTGTACAATTAAAGTGAACG	-19 bis +4
Mut37rev	GAAGTTCAGTGTCAAGTTTTGTGAAGATTGTCCGC	
Mut49rev	GAAGTTCAGTGTTAAGTTTTGTGAGATTGTCCGC	-61 bis -22
Mut3747rev	GAAGTTCAGTGTCAAGTTTTGTGGAAGATTGTCCGC	
Mut27rev	TACATACAGGATGTTTCAGTGTTAAG	-40 bis -16
Mut11rev	CGTTCACCTTAATTGCAAAATACATACAGG	-25 bis +4
Mut7rev	GAACGTTCACTTTACTTGTAATAACATACAGG	-25 bis +8
Mut17rev	GAACGTTCACTTTAATTGTAAATGCATACAGG	
Mut13rev	TTCACCTTAATTGTACAATACATACAGG	-25 bis +3
Del1rev	CATACAGTTCAGTGTTAAGTTTTGTG	-48 bis -18
Del2rev		
Del13rev	TTGTACAATACATACAGTTCAGTGTTAAGTTTTGTG	
Del37rev	TTGTAAATACATACAGTTCAGTGTCAAGTTTTGTG	-48# bis -8
Del1337rev	TTGTACAATACATACAGTTCAGTGTCAAGTTTTGTG	

*Position zum Transkriptionsstart bei *B. subtilis* 168; ** Position zum Translationsstart bei *B. amyloliquefaciens* FZB42; # Position auf dem wt-Promotor, 4 Basen kürzer auf dem deletierten Promotor

Tabelle 2: Primer zur Klonierung der Expressionsplasmide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Schnittstelle	Position zum Transkriptionsstart
AbrB3	GGAGGAGAATGCATATGAAATCTACTGG	NdeI	-9 bis +19
AbrB4	GAAGGTACGATGGGATCCATATTAAGC	BamHI	+344 bis +371
PhoP4	GGCACCATATGAACAAAAAATTTAGTTG	NdeI	-8 bis +21
PhoP5	CGCACTCGAGCTTTATTCATTCATT	XhoI	+710 bis 734
R231For	GGTGGTCTCCCATGCAGCGGGATCGGCTGCTGAC	BsaI	+679 bis +712
R231Rev	CTCCTCGAGGGCGGACTTTTCAGCGGCCCGTTTCAG	XhoI	+1710 bis +1745

Tabelle 3: Weitere Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bemerkung/Position	Hersteller
Cy3-Fang3	GGATTCTTGGGAGCCAGCCAAA TC	+201 bis +23	Biotez
RNA-Linker	GAUAUGCGCGAAUCCUGUAGAACGAACACU AGAAGAAA		CureVac
Om15	ATATGCGCGAATTCCTGTAGAACGAACACTAG	homolog zum RNA-Linker	Sigma ARK
Om03	TAAATGTGAGCGAGTAACAACCC	+369 bis +347 im <i>lacZ</i>	Sigma ARK

Tabelle 4: Nukleotide

	Arbeitslösungen	Hersteller
dNTP (A/T/C/G)	2 µM, 10 µM und 20 µM	Fermentas
dNTP (A/C/G)	2 µM	Fermentas
NTP-Lsg.	400 µM ATP, CTP und GTP + 0,6 µM UTP	Fermentas
DIG-dUTP	1 mM	Boehringer Mannheim
γ ³² P-ATP	10 µCi/µl, 30 µCi/µl	General Electrics (General Electrics)
α ³² P-UTP	10 µCi/µl	General Electrics (General Electrics)
dTTP-Lsg.	2 µM	Fermentas
ATP	100 µM	Roth

4.2 Plasmide

Tabelle 5: Ausgangsplasmide für Klonierungen

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
pDG268	<i>amyE::(cm^r spoVG-lacZ) Ap^r</i>	Antoniewski et al., 1990
pET28b	<i>Ap^r lacI</i>	Novagen
pET15b	<i>Ap^r lacI</i>	Novagen
pGEMT [®]	<i>Ap^r lacZα</i>	Promega
pECE73	<i>Cm^r::Nm^r</i>	Steinmetz und Richter, 1994

Tabelle 6: Derivate des pDG268- Plasmids mit unveränderten Promotorbereichen

Bezeichnung	Insert	Position relativ zum Transkriptionsstart
pOM2	<i>phyC</i> aus <i>B. subtilis</i> 168, Amplifikat Om01 und Om02, Klonierung über <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i>	-366 bis +193
pOM6	<i>phyC</i> aus <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB45, Amplifikat Om01 und Om09, Klonierung über <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i>	-287 bis 208

Zu dem pOM6-Plamid siehe auch Abbildung 7.6

Tabelle 7: Derivate des pDG268- Plasmids mit verkürzten *phyC*-Promotorbereichen

Bezeichnung	Insert	Position relativ zum Transkriptionsstart
pCUT145	Amplifikat mit Om09 und Cut1	-9 bis +208
pCUT245	Amplifikat mit Om09 und Cut2	-44 bis +208
pCUT345	Amplifikat mit Om09 und Cut3	-77 bis +208
pCUT445	Amplifikat mit Om09 und Cut4	-105 bis +208
pCUT545	Amplifikat mit Om09 und Cut5	-147 bis +208
pOM7	Amplifikat mit Om01 und Om14	-287 bis +29

Tabelle 8: pOM6-Derivate mit Basensubstitutionen im Promotorbereich

Bezeichnung	Bemerkung
pMUT7	Transversion an -7 T→G
pMUT11	Transition an -11 A→G
pMUT13	Transversion an -13 T→G
pMUT17	Transition an -17 T→C
pMUT27	Transversion -27 T→A
pMUT37	Transition -37 A→G
pMUT47	Transition -47 A→G
pMUT49	Transversion -49 T→G
pMUT1337	Transversion an -13 T→G, Transition -37 A→G
pMUT3747	Transition -37 A→G, Transition -47 A→G,

Tabelle 9: pOM6-Derivate mit 4 bp-Deletionen im Promotorbereich

Bezeichnung	Bemerkungen
pDEL1	Deletion -27 bis -24 in pOM6 SOE-PCR mit Primern Del1for, Del1rev, Om01 und Om09
pDEL3747	Deletion -27 bis -24 in pMUT3747 SOE-PCR mit Primern Del1for, Del2rev, Om01 und Om09
pDEL13	-13 T→G, Deletion -27 bis -24
pDEL37	-37 A→G, Deletion -27 bis -24
pDEL1337	-13 T→G, 37 A→G, Deletion -27 bis -24

Tabelle 10: Expressionsplasmide

Bezeichnung	Ausgangsvektor	Bemerkung
pPHOP	pET15b	His ₆ -Tag N-terminal, Thrombinschnittstelle
pPHOR231	pET28b	His ₆ -Tag C-terminal
pABRB	pET15b	His ₆ -Tag N-terminal, (Thrombinschnittstelle)

4.3 Stämme

Tabelle 11: Ausgangsstämme die als Rezipienten verwendet wurden

	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE hsdR17 recA1 ΔlacU169(Ø80/lacZΔM15) gyrA96 thi-1 endA1</i>	Maniatis et al. (1989)
BL21 (C43)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	Novagen
XLGold	<i>Tet^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>	Stratagene
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	BGSC
1A254	<i>trpC2 pheA1 phoP</i>	BGSC
MF1	<i>trpC pheA1 Km^r rpoC_{his6}</i>	Fujita, M. (persönliche Sammlung)

MATERIAL

1S13	<i>trpC2 spo0A13</i>	Ionesco et al. (1970)
1S34	<i>trpC2 spoIIIE61</i>	Piggot (1973)
GM1038	<i>ccpA::Tn917 (Δerm-lacZ)::phi sacA321 sacBΔ231</i>	
H12586	<i>pheA1 trpC2 abrB::cm^r</i>	Perego et al., 1998
<i>B. amyloliquefaciens</i>		
FZB45	<i>wt</i>	FZB

Tabelle 12: *E. coli*-Expressionsstämme

GVO	Rezipient	Vektor
ECPHOP	BL21 (C43)	pPHOP
ECPHOR	BL21 (C43)	pPHOR231
ECABRB	BL21 (C43)	pABRB

Tabelle 13: *E. coli*-Klonierungsstäme

GVO	Rezipient	Vektor
ECOM2	DH5α	pOM2
ECOM6	DH5α	pOM6
ECCUT1 bis 5	DH5α	pCUT1 bis pCUT5
ECCUT7	DH5α	pCUT7
ECMUT7 bis 49	XLGold	pMUT3 bis pMUT49
ECMUT1337	XLGold	pMUT1337
ECDEL1	DH5α	pDEL1
ECDEI13	XLGold	pDEL13
ECDEL37	XLGold	pDEL37
ECDEL1337	XLGold	pDEL1337
ECDEL3747	XLGold	pDEL3747

Tabelle 14: Weitere *B. subtilis* Stämme

GVO	Ausgangs-stamm	Integrierter Vektor	Genotyp
OMK	168	pDG268	<i>trpC2 amy::(Cm^r lacZ)</i>
1AK	1A254	pDG268	<i>trpC2 pheA1 phoP amy::(Cm^r lacZ)</i>
1S13K	1S13	pDG268	<i>trpC2 spo0A amy::(Cm^r lacZ)</i>
OM64KM	OM64	pECE73	<i>trpC2 spo0A amy::(Km^r lacZ)</i>
OM61KM	OM61		<i>trpC2 amy::(Km^r lacZ)</i>

Tabelle 15: *B. subtilis* Stämme zur Untersuchung der *phyC-lacZ*-Expression

GVO	Ausgangs-stamm	Integrierter Vektor/ DNA	Genotyp
OM61	168	pOM6	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{wt}- lacZ)</i>
OM13	OM61KM	chromosomale DNA aus H12586	<i>trpC2 amy::(Km^r phyC^{wt}- lacZ) abrB::Cm^r</i>

OM12	OM64KM		<i>trpC2 spo0A amy::(Km^r phyC^{wt}- lacZ) abrB::Cm^r</i>
OM67	GM1038	pOM6	<i>ccpA::Tn917 (Δerm-lacZ)::phi sacA321 sacBΔ231 amy::(Cm^r phyC^{wt}- lacZ)</i>
OM64	1S13	pOM6	<i>trpC2 spo0A amy::(Cm^r phyC^{wt}- lacZ)</i>
OM64-3		pCUT3	<i>trpC2 spo0A amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-77}-lacZ)</i>
OM64-4		pCUT4	<i>trpC2 spo0A amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-44}-lacZ)</i>
OM64-5		pCUT5	<i>trpC2 spo0A amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-9}-lacZ)</i>
OM64-7		pCUT7	<i>trpC2 spo0A amy::(Cm^r phyC^{3'Δ+29}-lacZ)</i>
OM62	1A254	pOM6	<i>trpC2 pheA1 phoP amy::(Cm^r phyC^{wt}-lacZ)</i>
OM145	168	pCUT1	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-9}-lacZ)</i>
OM245		pCUT2	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-44}-lacZ)</i>
OM345		pCUT3	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-77}-lacZ)</i>
OM445		pCUT4	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-105}-lacZ)</i>
OM545		pCUT5	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{5'Δ-147}-lacZ)</i>
OM71		pOM7	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{3'Δ+29}-lacZ)</i>
MUT7		pMUT7	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{T:G(-7)} - lacZ)</i>
MUT11		pMUT11	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{A:G(-11)}- lacZ)</i>
MUT13		pMUT13	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{T:G(-13)}- lacZ)</i>
MUT17		pMUT17	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{T:C(-17)}- lacZ)</i>
MUT27		pMUT27	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{T:A(-27)}- lacZ)</i>
MUT37		pMUT37	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{A:G(-37)}- lacZ)</i>
MUT48		pMUT48	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{A:G(-48)}- lacZ)</i>
MUT50		pMUT50	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{T:A(-50)}- lacZ)</i>
MUT3		pMUT3	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{T:A(-50)A:G(-48)A:G(-37)}- lacZ)</i>
DEL1		pDEL1	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{27Δ-24}- lacZ)</i>
DEL13		pDEL13	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{27Δ-2, T:G(13)}- lacZ)</i>
DEL37		pDEL2	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{27Δ-24, A:G(-37)}- lacZ)</i>
DEL1337		pDEL1337	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{27Δ-24, T:G(-13)A:G(-37)}- lacZ)</i>
DEL3747		pDEL3	<i>trpC2 amy::(Cm^r phyC^{27Δ-24, A:G(-47)A:G(-37)}- lacZ)</i>

4.4 Enzyme und andere Proteine

Tabelle 16: Restriktionsenzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller/Protokoll
<i>EcoRI</i>	10 U/μl	Fermentas
<i>BamHI</i>	10 U/μl	Fermentas
<i>NdeI</i>	10 U/μl	Fermentas
<i>HindIII</i>	10 U/μl	Fermentas
<i>SacI</i>	10 U/μl	Fermentas
<i>ApaI</i>	10 U/μl	Fermentas
<i>XhoI</i>	10 U/μl	Fermentas

Tabelle 17: Weitere Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller/Protokoll
Benzonuclease	25 U/μl	Merck
RNase H	100 mg/ml	Qiagen
RNase A	10 mg/ml	Fermentas
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)</i>	1 U/μl	Fermentas
Klenow-Fragment (<i>E. coli</i> Poll, large fragment)	5 U/μl	USB
M-MuLV-Reverse Transcriptase	20 U/μl	Fermentass
Proteinase K	20 mg/ml TE	Qiagen
RNA-Ligase	10 U/μl	Epicentre
<i>E. coli</i> RNA-Polymerase, Holoenzym	1 U/ μl	Epicentre
RNase	100 mg/ ml TE	Roth
RNase-Inhibitor	40 U/μl	Fermentas
T4-DNA-Ligase	1 U/μl	USB
<i>Tabacco Acid Pyrophosphatase (TAP)</i>	10 U/μl	Epicentre
Taq-DNA-Polymerase	5 U/μl	Bioron
Pfu-DNA-Polymerase	2,5 U/μl	Fermentas
Pwo-DNA-Polymerase	2,5 U/ μl	Genaxxon
DNaseI	500 U/ml	Worthington
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	10 U/μl	Fermentas
Lysozym	135000 U/ mg	Serva

Tabelle 18: Verwendete Antikörper

Antigen	IgG	Konjugat		Hersteller
His ₆ -Tag	Kaninchen			Santa Cruz
FZB45-Phytase	Kaninchen, total Periplasma			Dr. J. Pineda
Digoxigenin (Dig)	Kaninchen	Alkalische (AP)	Phosphatase	Roche-Applied-Sciences
Kaninchen IgG	Ziege	Alkalische (AP)	Phosphatase	Sigma

4.5 Antibiotiker und Substrate

Tabelle 19: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	20mg/ml	20 μg/ml	Roth
Chloramphenicol	5mg/ml	5 μg/ml	Merck
Kanamycin	5mg/ml	5 μg/ml	Serva

Tabelle 20: Verwendete Enzymsubstrate

Substrat	Reaktionslösung	Hersteller
BCIP NBT	50 mg/ ml in 70 %-igen Formaldehyd	Roth
ONPG	4 mg/ ml in Z-Puffer	Serva
PNPP	1 mg/ ml in 1 M TrisHCl, pH	Fulka
X-Gal	20 mg/ ml in Dimethylformamid	Roth

4.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 21: Verwendete Puffer und Gemische

Bezeichnung	Zusammensetzung
Enzymtests:	
APase-Puffer	1 M TrisHCl (pH 8), 0,2 mg/ ml Lysozym, 0,5 U/ ml Benzonuclease, 100 µg/ ml Chloramphenicol, 0,0005 % SDS
Phytase-Puffer	in 50 mM TrisHCl (pH7) + 5 mM CaCl ₂ + 1mM MgCl ₂
Phytase-Stoppreegenz	10 ml Ammoniummolybdatlsg., 10 ml Ammoniumvanadatlg., 6,6 ml HNO ₃ (65%), ad 40 ml A. bidest.
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O, 50 mM DTT, 0,3 mg/ ml Lysozym, 100 µg/ ml Chloramphenicol, 0,005 % TritonX100, 0,5 U/ ml Benzonuclease
DNA / RNA-Arbeiten:	
1 X TE-Puffer	10 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
5 X Binding-Puffer	100 mM TrisHCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 50 % Glycerin, 500 mM, 500 mM KCl
5 X Transkriptionspuffer	100 mM TrisHCl, pH8, 50 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl, 5 mM CaCl ₂ , 100 µM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin
DNaseI-Stopp	0,4 M NaAcetat, 50 µg/ml Calf Thymus-DNA, 2,5 mM EDTA
DNaseI-Verdünnungs-Lsg	10 mM MgCl ₂ , 5 mM CaCl ₂
Elektrophorese:	
TAE-Puffer	40 mM Tris, 1,1 ml/ l Eisessig, 1 mM EDTA, 0,5 µg/l Ethidiumbromid
10 X TG-Laufpuffer	250 mM TrisHCl, 1,92 M Glycin, pH 8,8
10 X TBE	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA
10 X MEN-Puffer	200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat, 10 mM EDTA
SDS-Acrylamidgele	<i>Trenngel</i> : 10 % oder 12 % AA/BAA (29 :1) in 0,375 mM TrisHCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,075 % APS, 0,05 % TEMED <i>Sammelgel</i> : 4 % AA/BAA (29 :1) in 0,19 mM TrisHCl (pH 6,8), 0,15 % SDS, 0,075 % APS, 0,075 % TEMED
DNA-Agarosegel	0,8%, 1,2% und 1,5% in 1 x TAE-Puffer
RNA-Agarosegel	1 % und 1,5 % in 1x MEN-Puffer, 5,6 % Formaldehyd
Urea-Acrylamidgel	6 % AA/BAA (19:1), 1,2 X TBE, 8 M Harnstoff, 0,08 % APS, 0,01 % TEMED
Natives Acrylamidgel	6 % AA/BAA (29:1), 1 X TBE, 0,03 % Glycerin, 0,08 % APS, 0,01 % TEMED
SDS-Laufpuffer	1X TG-Puffer, 1 % SDS
Trenngelpuffer	1,5 M TrisHCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	0,5 M TrisHCl (pH 6,8)
Blot-Puffer	1X TG-Laufpuffer, 20 % Methanol

MATERIAL

Zellmanipulation:	
Lysispuffer	20 mM TrisHCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 4 mg/ml Lysozym (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Resuspensionspuffer	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA
Sonifikationspuffer	50 mM TrisHCl (pH 7,5), 5 mM MgSO ₄ , 1 M NaCl
I-Puffer	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 0,1 M KCl, 1 β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin
Transformationspuffer	1 X SSM, 1 mM EGTA, 0,5 % Glukose, 20 mM MgCl ₂
Blotting-und Entwicklungslsg.:	
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	1 M TrisHCl (pH 8), 1,35 M NaCl
20X SSC	175 g/ l NaCl, 88,2 g/ l Na-Citrat-Dihydrat
Northern-Hybridisierungspuffer	5 x SSC, 20 mg/ ml Blockingreagenz, 0,1 % N-Laurylsarkosin, 0,02 % SDS, 50 % Formamid (deionisiert)
P1-Dig-Puffer	100 mM Maleinsäure (pH 7,5), 150 mM NaCl
P2-Dig-Puffer	1 % Blockingreagenz in P1-Puffer
AP-Puffer	100 mM TrisHCl (pH 9,5), 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl
10 X TBST	100 mM Tris pH 8,0, 1,5 M NaCl, 0,5% Tween 20
Proteinfärbungslsg.	0,2 % Coomassie R250, 0,05 % Coomassie G250, 42,5 % A. bidest, 42,5% Ethanol, 10 % Essigsäure, 5 % Methanol
Entfärber	1 v/ v konz. Essigsäure, 1 v/ v Ethanol (96 %), 5 v/ v A. bidest
Nickel-Agarose-Säule:	
B-Puffer	50 mM TrisHCl (pH 8), 20 % Glycerin, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol
I-Puffer	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 20 % Glycerin
Ni-Waschlösung	0,2 % Essigsäure, 10 % Glycerin
Ni-Restore-Lösung	30 % Ethanol, 10 % Glycerin
Imidazol-Lösungen	1 M, 6 M in TrisHCl-Puffer 1 M, (pH 7,59)
Sonstige Puffer	
Na-Phosphatpuffer	1 M Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH 7,0
K-Phosphatpuffer	1 M K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ pH 7,0
TrisHCl-Puffer	1M, 50mM pH 7,5 und 1 M und 3 M pH 8
10 X TE	100 mM TrisHCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8)
Ladepuffer :	
6 X DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin, 10 mM EDTA (pH 8), 0,25 % Bromphenolblau
Stopp-Solution	95 % deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA (pH 8), 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol
1,6 X RNA-Ladepuffer	0,75 x MEN, 28,5 % deionisiertes Formamid, 3 % Formaldehyd, 16 µg / ml Ethidiumbromid
5 X SDS-Ladepuffer	0,125 TrisHCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 1,4 M β-Mercaptoethanol, 0,1v% Bromphenolblau
Salzlösungen:	
10 X SSM	20 g/ l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 140 g/ l K ₂ HPO ₄ , 60 g/ l KH ₂ PO ₄ , 10 g/ l Na-Citrat-Dihydrat
10 X Salzlösung	14 mM MgSO ₄ , 17 mM MgCl ₂ , 4,7 mM KCl, 3 mM CaCl ₂
10 X Peptonlösung	1% Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut), 0,45% Pepton aus Soja (papainisch verdaut), 5% NaCl

Tabelle 22: Weitere Lösungen

Lösung	Konzentration der Arbeitslösungen	Hersteller
Fruktose	20 %	Merck
Inositol	20 %	Merck
Glukose	20 % und 50 %	Merck
NaPhytat (phytic acid sodium salt hydrate $C_6H_{18}O_{24}P_6 \times Na^+ yH_2O$)	20 %	Sigma
lösliche Amylose	20 %	Merck
NaOH	2 M	Merck
CaCO₃	1 M	Serva
APS	10 %	Merck
SDS	10 %	Roth
CaCl₂-Lsg	100 mM	Serva
MgCl₂-Lsg.	100 mM	Roth
Formiat	4 %	Merck
Piperidine	1 M	Merck
Ethanol (reinst)	70 %	Merck
FeCl	4 mg/ ml	VWR
NaAcetat	3 M, pH 5	Roth
PMSF	100 mM	Serva

4.7 Medien

Alle Festmedien wurden mit 1,5% Agar-agar angesetzt. Je nach Bedarf wurden zu den Medien zusätzliche Aminosäuren, Antibiotika und andere Zusätze in den oben aufgeführten Endkonzentrationen zugegeben.

Tabelle 23: Vollmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB	10 g/ l Casein (tryptisch verdaut), 5 g/ l Hefeextrakt, 10 g/ l NaCl, pH 7,5
2 X TBY	0 g/ l Casein (tryptisch verdaut), 10 g/ l Hefeextrakt, 5 g/ l NaCl, pH 7,5
SOC	20 g/ l Bacto-Trypton, 5 g/ l Hefeextrakt, 0,5 g/ l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose
NZY⁺	10 g/ l Caseinhydrolysat, 5 g/ l Hefeextrakt, 5 g/ l NaCl, 12,5 mM MgCl ₂ , 12,5 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, pH 7,5

Tabelle 24: Minimalmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
KM1	1X SMM, 100 mM MgSO ₄ , 0,5 % Glukose, 0,04 % Casamino-Acids, 0,04 mg/ml L-Tryptophan
KM2	1X SMM, 100 mM MgSO ₄ , 0,3 % Glukose, 0,005 % Casamino-Acids, 0,04 mg/ml L-Tryptophan, 0,5 mM CaCl ₂
LPM	1X Pepton, 1X Salzlösung, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 0,05 % Na-Glutamat (pH 7), 0,5 % Glukose
HPM	wie LPM, 10 mM K-Phosphatpuffer

4.8 Sonstiges

Tabelle 25: Fertigreagenzien und weitere Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
29:1 Acrylamid / Bisacrylamid, 40%	Roth
19:1 Acrylamid / Bisacrylamid, 40%	Roth
Bradfordreagenz	Roth
Ni-Agarose	Qiagen
Fixierer und Färber	Elmar-Perkin
Phenol (TE gesättigt)	Roth
Saures Phenol, pH 4	Roth
30% N-Laurylsakrosin-Lösung	Serva
Formamid, deionisiert	Roth
TEMED	Roth
Formaldehyd	Merck
konzentrierte HCL	Merck
konzentrierte Salpetersäure	Merck
Harnstoff	ICN
Agar-agar	Serva
Agarose	Roth
Isopropanol	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
Tween 20	Biorad
Ethanol (reinst) 96 %	Merck
Lugolsche Lösung	Merck

Tabelle 26: Molekular-Marker

Bezeichnung	Hersteller
Lambda DNA/ EcoRI+HindIII Marker	Fermentas
O'RangeRuler™ 100bp+500bp DNA Ladder	Fermentas
RiboRuler™ RNA Ladder, Low Range	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

Tabelle 27: Kommerzielle Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
QIAquick Nukleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
pGEM®-T Vector System	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Midiprep tip100 und tip20	Qiagen

Protino Ni-TED 1000 packed columns kit	Machery-Nagel
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kits	Stratagene
Sigma Thrombin CleaveClean Kit	Sigma
NucleoSpin RNA L	Machery-Nagel
Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit	General Electrics
DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit	General Electrics
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	General Electrics
Ready-to-go-Kit	Roche-Applied-Sciences

Tabelle 28: sonstige Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Elektroporationsküvetten	Eurogentec
Quarzküvette	Hellma
Küvetten	Sarstedt
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Kunststoffpipettenspitzen mit Filter	Sorenson
Kunststoffpipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Combitips	Eppendorf
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
Polyethylenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Roth
14-ml BD Falcon polypropylene round-bottom tubes	BD Biosciences
Nylonmembran positive charged	Roche-Applied-Sciences
Nitrozellulose	Machery-Nagel
Whattman Papier	Machery-Nagel
Röntgenfilmkassetten	General Electrics Biosciences
Röntgenfilme Hyperfilm™ MP	General Electrics Biosciences
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak, England
Sterilfilter (0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schüll
sonstige Glas- und Kunsstoffmaterialien	Roth

4.9 Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet, soweit sie unter den jeweiligen Methoden nicht aufgeführt sind:

- Pipettiert wurde mit automatischen **Eppendorf**-Pipetten.
- Die Kulturen wurden im Schüttler von **HT** inkubiert und Zellaufschlüsse mittels **XXX** vorgenommen.
- Sterilisiert wurde im Trockenschrank von **Heraeus** und im Dampfsterilisator **Varioklav** von **H+P**.
- Zum Abwiegen wurden die Präzisionswaage **MC1** und **PT13100** von **Sartorius** verwendet.
- Der pH-Wert wurde am **pH-Meter 761 Calimetric** von **Knick** und die Radioaktivität am **Beta-Counter** (Packard) gemessen.
- Die PCRs wurde im Thermocycler von **MJ Research Inc**, Modell **PTC100™** und **GeneAmp®PCR System 2700** von **Applied Biosystems** durchgeführt.
- Eppendorf-Gefäße wurde in der **Biofuge piccolo** von **Heraeus** zentrifugiert, für größere Volumina wurde die **Sorvell RC5B** verwendet.
- Zum Temperieren wurde der Thermoblock von **Grant**, Modell **QBT2** benutzt

- Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in der Apparatur von **Biomertra** (Modell **S2**) durchgeführt, geblottet wurden die Gele mit dem Vakuumblotter von **BioRad**, Modell **785**
- Gele wurden in **Gel Dryer 583 (BioRad)** getrocknet. Zum Trocknen und Einengen von Flüssigkeiten wurde der **Concentrator 5301** von **Eppendorf** benutzt.
- Digitalisierung von Gelen wurde am Imager **Gene Geniun** von **Bio Imaging Systems** (Merck) vorgenommen. Radioaktive Images wurden mit dem **Molecular Imager FX pro plus (BioRad)** eingelesen und die Filme in **Kodak X –Omat** entwickelt.
- Photometrische Messungen erfolgten am Ultraspec200 von **General Electrics Biotech** sowie an Multiscan **Ascent** von **Labsystems**.
- Für die Protein-Gelelektrophorese sowie DNA-Elektrophorese (EMSA) wurde die Apparatur **Protean 3 Minicell (Biorad)** benutzt.
- Primerextension-, Footprint- und *in vitro* Transkription-sreaktionen wurden im **SequiGen™ Sequencing gel** von **Biorad** elektrophoretisch getrennt.
- Für Western-Blots wurde der **Trans-blot-SD Semi Dry- Transfer Cell** von **BioRad** verwendet.
- Hybridisierungen wurden im Rolloffen von **Biometra** vorgenommen.

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Stammhaltung von Kulturen

Die Zellen wurden in Vollmedium über Nacht angezogen und als 10%ige Glycerinkonserven bei -80°C angelegt.

5.1.2 Kultivierung

Selektion der Transformanten

Für die Selektion aller Transformanten wurde LB-Agar als Grundmedium benutzt und mit den entsprechenden Antibiotika (Endkonzentrationen siehe Tabelle 19) versetzt. Die Integration der pDG268-Dervate ins amy-Gen bei *Bacillus subtilis* wurde zusätzlich auf Amylose-LB-Platten überprüft. Dabei wurden die Kolonien auf den Platten über Nacht inkubiert und anschließend die Platten mit Lugolscher Lösung beschichtet. Bei positiven Klonen konnte man dabei keinen hellen Hof um die Kolonie erkennen, da die Zellen die Amylose nicht abbauen konnten.

Zellkulturen für Enzym-Assay

Von den Klonen wurden Standkulturen in 10 ml LB-Cm angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am morgen wurde die OD_{600} gemessen und 20 ml verschiedener Varianten von Minimalmedium-Kulturen wurden zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft. Inkubation erfolgte bei 37°C und 200 rpm. Die OD_{600} wurde verfolgt. Stündlich wurden Proben von je 0,5 ml entnommen.

Zellkulturen für Proteinreinigung

Für die Reinigung von PhoP und PhoR231 sowie AbrB wurden 50 ml LB-Ap-Kulturen übernacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Daraus wurden dann 500 ml Kulturen in 2xTBY-Ap zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Beim Erreichen der OD_{600} von 0,5 wurde IPTG zu einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und die Kulturen weitere 3 – 4 h inkubiert, danach Erfolgte eine Pelletierung bei 5000 rpm und 4°C im Sorvell GS3 Rotor.

Für die Reinigung von RNAP wurde MF1 in 20 ml LB-Km angeimpft und übernacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 200 ml der LB-Km-Hauptkultur wurde zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 1 bei 37°C und 200 rpm weiter inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 rpm im Sorvell GS3-Rotor pelletiert. Der Zellaufschluss wurde wie von Fujita und Sadaie (1998) beschrieben durchgeführt.

5.1.3 Herstellung kompetenten Zellen und Transformation

Ca^{2+} -kompetente *E. coli*-Zellen

(nach Sambrook1989)

Aus einer ÜN-Kultur (5 ml LB, 37°C) wurde durch 1:100 Verdünnung eine frische Kultur in 100 ml LB angeimpft und bis zur OD_{600} von 0,5 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4°C und 4000 rpm 10 min im GS3-Rotor abzentrifugiert (Sorvell RC5B). Ab hier wurden alle Schritte auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde in 30 ml MgCl_2 (0,1 M) gewaschen und wie oben zentrifugiert, danach in 5 ml CaCl_2 (0,1 M) resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert, und bei 4°C und 3500 rpm 10 min im SS34-Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 4,3 ml kaltem CaCl_2 (0,1 M) resuspendiert und 0,7 ml Glycerinlösung (87%) wurden zugegeben. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Tubes zu 200 μl aliquotiert und bei -80°C schockgefrorenen. Die CaCl_2 -kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 100 μl Zellen wurden steril 5-10 μl des Ligationansatzes pipettiert. Die Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 μl LB wurde der Ansatz für 1 h im Schüttler bei 37°C inkubiert. 200 μl des Ansatzes wurden auf selektiven Platten ausplattiert und bei 37°C bebrütet.

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen und Elektroporation

Aus einer ÜN-Kultur des Stammes BL21 (C43) wurden 100 ml LB zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht hat. Die Zellen wurden bei 4 °C und 5000 rpm im Sorvall GS3 Rotor pelletiert, zwei mal mit 100 ml eiskaltem A. bidest gewaschen und in 1 ml eiskaltem A. bidest aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Tubes zu 50 µl aliquotiert und bei –80 °C schockgefrorenen.

Die Aliquots wurden auf Eis aufgetaut und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Nach Zugabe von ca. 100 ng Plasmid-DNA wurden die Ansätze 10 min auf Eis inkubiert, dann einem Elektroschock mit 1,7 kV 25 µF und 200 Ω für 1 Sekunde ausgesetzt und sofort gekühlt. Dann wurden 800 µl vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 1,5 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Aliquots von 200 µl wurden auf entsprechende LB-Platten ausplattiert.

Transformation von XL2-Blue Ultrakompetenten *E. coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte streng nach Herstellerprotokoll (Stratagene). Transformiert wurden die mutagenisierten pOM6-Derivate. Die Selektion erfolgte auf LB-Ap-Agar.

Herstellung und Transformation natürlich-kompetenter *B. subtilis*-Zellen

(nach Harwood, 1990)

Aus einer ÜN-Kultur (10 ml KM1, 37 °C) wurde durch 1:10 Verdünnung eine frische Kultur in 50ml KM1-Medium angelegt, und bis zum Eintritt in die Stationäre Phase (ca. 4 h) bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden die Zellen 1:5 im KM2-Medium verdünnt und 75 min inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 2 ml Tubes überführt und für 2min bei 6000rpm abzentrifugiert. 5 ml der Überstände wurden steril vereint und mit 50 µl Glucose (50 %-ig) und 500 µl Glycerin (87 %-ig) versetzt. Die Zellpellets wurden in 200 µl dieses Überstandes vorsichtig resuspendiert und bei –80 °C schockgefroren. Die eingefrorenen kompetenten Zellen wurden bei 37 °C rasch aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml KM2. Für jeden Transformationsansatz wurden 200 µl Zellsuspension in ein 25 ml Zentrifugenglas pipettiert und mit 1-5 µg DNA* für 20min bei 37 °C und 75 rpm inkubiert. Dann wurden 500 µl vorgewärmten LB + 0,1 µg / ml Antibiotikum zugegeben und die Transformationsansätze für 1,5 h bei 37 °C und 200 rpm weiter inkubiert. 200 µl und 400 µl wurden auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37 °C bebrütet.

* Bei Transformationen von pDG268-Derivaten wurden diese erst mit XhoI linearisiert. Anschließend wurden ca. 1-5 µg der DNA im Restriktionsgemisch direkt transformiert.

5.1.4 Zellaufschluss

Sowohl *E. coli* als auch *Bacillus* Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellsuspensionen auf Eis gekühlt und bei einer Intensität von bis zur 80% und mit einem Cyclus von 50 beschallt. Nach jeweils 30 Bursts wurde eine 30 sekundige Pause eingelegt. Dies wurde so lange wiederholt, bis die Zellsuspension eine gräulich opalisierende Farbe aufwies. Um der proteolytischen Verdau zu unterbinden wurde vor dem Aufschluss PMSF zu einer Konzentration von 10 mM zugegeben. Bei *Bacillus*-Zellen wurde zusätzlich Lysozym (1 mg/ml) zugesetzt.

5.2 Gentechnische Methoden

5.2.1 Stammhaltung von Nukleinsäuren

Chromosomale DNA aus Bakterien wurde in 1 X TE-Puffer bei 4 °C, Plasmid-DNA in A. bidest bei –20 °C und gesamt-RNA in RNase-freiem A. bidest bei –80 °C gelagert.

5.2.2 Amplifikation

Kolonie-PCR

Es wurde etwas Material mit einen sterilen Zahnstocher von frischen Kolonien der Mutanten in den PCR-Ansatz überführt und dann eine Standard-PCR mit 20-25 Zyklen durchgeführt. 10 µl der Ansatzes wurden im analytischen Agarosegel untersucht.

Standard-PCR

Die Temperatur für das Annealing (50-55°C) in der PCR wurde je nach Sequenz und Homologie der Primer berechnet:

$$\begin{array}{r} 4^{\circ}\text{C für jedes G} \equiv \text{C} \\ 2^{\circ}\text{C für jedes A} = \text{T} \\ \hline - 20^{\circ}\text{C} \end{array}$$

Die Dauer der Polymerisation ergab sich aus der Länge der zu amplifizierenden DNA: min/kb.

Konzentrationen der Komponenten:		Ablauf der PCR:	
		Temperatur [°C]	Dauer [min]
1 x	Pfu-Puffer (+MgCl ₂)	94	2
200 µM	dNTP's		
0,4 – 1 µM	Primer →		
0,4 – 1 µM	Primer ←		
	Matrize:	30	0,5
10-50 ng	Plasmid oder freie DNA	Zyklen	
0,1-0,5 µg	chromosomale DNA		0,5
0,1 U/µl	Pfu- DNA- Polymerase	72	0:45-1:15

Nach Beendigung der PCR wurde 1/10 des PCR-Ansatzes zur Kontrolle auf einem Agarosegel untersucht.

SOE-PCR

Um eine 4 bp-Deletion im *phyC*-Promotor einzufügen, wurden zuerst Standard PCRs durchgeführt: (1) mit Om01 und Del1rev als Primer und pOM6 als Matrize (bzw. Del2rev und pMUT3747 als Matrize), (2) mit Om09 und Del1for als Primer und pOM6 bzw. pMUT3747. Die entstandenen Fragmente wurden aus dem Gel mittels QIAGEN Gel Extraction Kit gereinigt und als Matrizen in der SOE-PCR zusammen mit Om01 und Om09 eingesetzt. Entscheidend hierfür waren die niedrigen Konzentrationen mit 1 ng je Matrize in 100 µl Ansätzen und 400 nM Primer. Die anderen Komponenten wurden Entsprechend der Standard-PCR verwendet. Die 507 bp Fragmente wurde ebenfalls aus dem Gel extrahiert.

RT-PCR

Die Reverse Transkription wurde nach Protokoll von Fermentas durchgeführt.

„Site directed“ Mutagenese

Die „Site directed“ Mutagenese wurde mit dem QuickChange XL-Kit von Stratagene strikt nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

5.2.3 Ligationen

Standard-DNA-Ligation

Ligationen wurden meist in 10 µl Ansätzen durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor und Insert variierte zwischen 1:3 und 1:6, je nach Vektor- und Insert-Größe. Die Legationsansätze wurden bei 16°C über Nacht inkubiert.

Konzentrationen in dem Reaktionsansatz:	
1 x	T4-Lig.-Puffer
50 ng	Vektor
50- 300 ng	Insert- DNA
1 U	T4- DNA- Ligase

Ligation in pGEMT

(Modifiziert nach PROMEGA)

Der Vektor pGEMT® wurde für Klonierungen von PCR-Produkten verwendet, sowie zur Sequenzierung. Die Ligationsansätze wurden bei 16 °C über Nacht inkubiert.

Pipettierschema für den Reaktionsansatz:	
1 x	Lig.-Puffer
50 ng	pGEMT-Vektor
3,75 µl	Insert- DNA
0,75 µl	DNA- Ligase

5.2.4 DNA-Fällungen

NaAcetat/Ethanol-Fällung

Diese Fällung wurde nach enzymatischer Behandlung der DNA verwendet. Der Ansatz wurde mit A. bidest auf 100 µl aufgefüllt. Dazu wurden 10 µl NaAcetat (3 M, pH 5) und 300 µl Ethanol (98%) zugegeben. Die DNA wurde für mindestens 30 min bei –20 °C gefällt, danach bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, und wie oben zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde die DNA bei 37 °C bzw. RT getrocknet und in A. bidest aufgenommen.

Ethanol-Fällung

Diese Methode wurde zur Fällung von präparativ-gewonnener DNA benutzt (Plasmid-Minipräparationen, Isolierung chromosomaler DNA).

Die Ansätze wurden mit 3 Volumenteilen kalten 98%igen Ethanol bei –20 °C für mind. 30 min gefällt und wie oben zentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in A. bidest oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

Isopropanol-Fällung

Diese Methode wurde ebenfalls zur Fällung von präparativ-gewonnener DNA benutzt (Plasmid-Midipräparation). Die Ansätze wurden mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt und für mind. 10 min bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in A. bidest oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

5.2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung chromosomaler DNA

Eine 10 ml LB-Kultur wurde 10 min bei 6000 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert (Sorvell RC5B) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1,5 ml Resuspensionspuffer gewaschen und in 700 µl Lysispuffer resuspendiert, dann 10min auf Eis und anschließend 10min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl N-Laurylsakrosyl (30%) und 4 µl ProteinaseK (20 mg/ml) erfolgte die Inkubation bei 70 °C für 20 min. Anschließend wurden die Ansätze 2 min auf Eis kühlte. Mit 700 µl Phenol wurden die Ansätze gemischt, bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Tube überführt. (Dieser Schritt wurde 1-2 mal wiederholt bis die Interphase nicht vorhanden war.) Die wässrige Phase wurde mit 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt, 5min bei 13000rpm zentrifugiert und in ein neues Tube überführt. Nach Zugabe von 5 µl RNase wurden die Ansätze 15 min bei 37 °C inkubiert, die DNA mit 1 ml Ethanol (96%) 10min auf Eis gefällt und 10 min bei 13000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 100 µl 1xTE-Puffer bei RT über Nacht gelöst.

Isolierung von gesamt-RNA

(Modifiziert nach Machery-Nagel)

Aus 20 ml FZB45-Kulturen wurde die gesamt-RNA nach Protokoll von Machery-Nagel unter Verwendung des RNA-L-Kits durchgeführt. Die Lysozymbehandlung und die DNase-Behandlung wurde auf 30 min verlängert. Wurde noch rest-DNA festgestellt (PCR-Test) erfolgte ein DNase-Verdau nach Herstellerprotokoll (Fermentas).

Plasmidpräparationen

a Mini- Plasmidpräparation

Je 1,5 ml von ÜN-Kulturen wurden pelletiert (2min, 13000rpm). Das Pellet wurde in 100 µl PufferI resuspendiert mit 200 µl PufferII versetzt und bis zur Klärung vorsichtig geschwenkt. Nach Zugabe von 150 µl PufferIII wurde der Ansatz geschwenkt und 10min auf Eis inkubiert. Der SDS-Niederschlag wurde 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt (s.o.) und das Pellet in 50 µl A. bidest resuspendiert.

b Spin- Plasmidpräparation

Die Spin-Präparation wurde nach Vorschrift mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit durchgeführt.

c Midi- Plasmidpräparation

Je nach gewünschter Menge der zu isolierenden DNA wurden die QIAprep Midiprep Kits TIP 100 oder TIP 20 verwendet.

Reinigung von Nukleinsäuren

d Extraktion aus Agarose-Gelen

(nach Qiagen)

QIAquick Gel Extraction Kit wurde für Reinigung von DNA nach PCRs und Restriktionen verwendet. Dabei wurde die DNA in einen 0,8 %-igem Agarosegel getrennt und die zu reinigende Bande unter schwachem UV-Licht () ausgeschitten und die DNA nach Protokoll des Herstellers gereinigt.

e Reinigung aus wässrigen Lösungen

QIAquick PCR-Purifikation Kit wurde zur Aufreinigung der PCR-Produkte für Sequenzierungsreaktionen und zur Entfernung von kleinen DNA-Fragmenten benutzt, wie Primern oder nach Restriktionen von Inserts. QIAquick Nukleotide Removal Kit wurde zum Entfernen der radioaktiven Nukleotide nach der Markierung verwendet. Beide Reinigungen wurden streng nach Herstellerangaben durchgeführt.

f Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode wurde zur Reinigung der DNA und RNA nach enzymatischen Reaktionen verwendet. Dazu wurde das Ansatzvolumen auf 100 µl gebracht und mit 100 µl Phenol*/ Chloroform (1:1-Lösung) geschwenkt, anschließend bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Tube überführt und mit einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) geschwenkt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde die obere Phase mit Ethanol/ NaAcetat (0) gefällt.

* Für Fällungen von RNA wurde saures Phenol (Roth) benutzt

5.2.6 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde am UV-Photometer von General Electrics (Modell: Gene Quant II) gegen A. bidest bestimmt. Dafür wurden die Proben 1:50 bzw. 1:100 verdünnt und die Absorption bei 280 nm und 260 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentrationen beruht auf folgenden Annahmen:

Für RNA → $A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}$

Für DNA → $A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$

5.2.7 Dephosphorylierung der DNA

Um die Religation von geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte 1 Stunde bei 37 °. Danach wurde die Reaktion bei 65 °C (15 min) gestoppt und auf Eis gekühlt. Die DNA wurde mit Ethanol und NaAcetat gefällt (s. oben).

Konzentrationen in dem Reaktionsansatz:

1 x	CIAP-Puffer
10 U	CIAP
1- 2 µg	Vektor- DNA

5.2.8 Restriktionen

Restriktionen wurden mit Enzymen von Qbiogene oder Fermentas nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die eingesetzte Menge an DNA variierte je nach Bedarf, für präparative Restriktionen wurde mindestens 1 µg DNA verwendet.

5.2.9 5' RACE

a Dephosphorylierung der RNA

(Modifiziert nach Epicentre)

Für die 5'RACE wurden die 5'-Enden der gesamt-RNA mit einer Pyrophosphatase dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte eine Stunde bei 37°. Danach wurde die RNA Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol und NaAcetat über Nacht bei -20°C gefällt (s. oben).

Konzentrationen in dem Reaktionsansatz:

1 x	TAP-Puffer
10 U	TAP
5-10 µg	gesamt RNA

b Ligation des Linkers

(Modifiziert nach Epicentre)

Die dephosphorylierte gesamt-RNA (Pellets aus (a)) wurde zuerst in 58 µl RNase-freiem A. bidest aufgenommen. Die Ligationen erfolgten in 100 µl Ansätzen für eine Stunde bei 37°C. Danach wurde die RNA Phenol/ Chloroform extrahiert und anschließend mit NaAcetat und Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Konzentrationen in dem Reaktionsansatz:

1 x	RNA-Ligase-Puffer
80 U	RNase-Inhibitor
5-10 µg	gesamt-RNA
10 pMol	Linker
20 U	RNA- Ligase

c RT-PCR

(Modifiziert nach Fermentas)

Die gefällten Ansätze aus (b) wurden in 20 µl A. bidest aufgenommen und 5 µl wurden anschließend für die RT-PCR verwendet. Die Amplifikation erfolgte sonst nach Herstellervorgaben. Es wurde der Om09 Primer verwendet.

d Nested-PCR

Als Matrize für die folgende PCR wurden 5 µl der RT-PCR Ansätze verwendet und die Primer Om15 und Om16 (5' versetzt zu Om09). Die PCR wurde wie unter 0 beschrieben durchgeführt.

5.2.10 Northern-Blot

(nach Roche-Applied-Sciences)

20 µg gesamt-RNA wurden in einem 1% denaturierendem Agarose Gel für 1-2 Stunden bei 60 V getrennt. Zwei Stück 3mm-Whatmann-Pappier und die Nylonmembran (positiv geladen) wurden in 2 X SSC äquilibriert. Gebロットet wurde für 4 Stunden mit 10 X SSC bei RT durch Kapillarwirkung. Die RNA wurde danach an die Membran durch 3 minütige UV-Bestrahlung gebunden. Die Hybridisierung im Rolloffen (Biometra) erfolgte bei 50°C über Nacht im RNA-Hybridisierungspuffer unter Zugabe einer nichtradioaktiven DNA-Sonde (PCR-Produkt von Om08 und Om09). Die Hybridisierungslösung wurde

danach samt Sonde bei -20°C bis zur Wiederverwendung aufbewahrt. Die Waschschr tte der Membran waren wie folgt: zwei mal 5 min mit 50 ml 2XSSC+0,1% SDS bei RT und danach zwei mal 15 min mit 0,5XSSC+0,1 SDS bei 50°C . Die Membran wurde anschlie nd in 10 ml P2-Dig-Puffer für 30 min geblockt, danach erfolgte die Zugabe von 1 l Anti-Dig-Antikörper und eine Inkubation von 1 h bei RT. Die Membran wurde dann zwei mal 15 min mit 50 ml P1-Dig-Puffer gewaschen und 1 mal 5 min mit 20 ml APase-Puffer  quibriert. Die Entwicklung erfolgte in 10 ml APase-Puffer mit jeweils 45 Öl der NBT- und BCIP-Lösungen im dunkeln bis die Blaufärbung gut sichtbar wurde. Die Reaktion wurde mit 10XTE gestoppt.

5.2.11 Markierung der DNA

Nichtradioaktive Markierung mit Dig-dUTP

Die nichtradioaktive Markierung erfolgte nach Protokoll von Roche-Applied-Sciences für die Markierung mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ mittels der Ready-To-Go DNA Labelling Beads. Dabei wurden die Beads mit 50 Öl eines Gemisches aufgenommen, welches aus 50  M Did-11-dUTP, 150  M dTTP und 200  M dATP/dCTP/dGTP bestand. Die Reaktion wurde bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Radioaktive Markierung mit $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{dATP}$

Am 5'-Ende eines Primers wurde mittels der Polynukleotidkinase (PNK) ein radioaktives Phosphat angehangen (nach Vorschrift von Fermentas). Dazu wurde 20 pmol Primer und 40  Ci $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$ im 10 Öl Ansatz verwendet. Mit dem gesamten Markierungsansatz und dem entsprechenden korrespondierenden kaltem Primer (20 pmol) wurde dann eine Standard-PCR durchgeführt unter Verwendung von 50 ng gereinigter Matrize. Das DNA-Fragment wurde mit dem QIAGEN PCR-Purifikation Kit gereinigt und die radioaktive Quantität bestimmt. Dazu wurde 1 Öl der gereinigten DNA in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytik) aufgenommen und die radioaktiven Zerfälle/ min gezählt. Die DNA wurde auf 50000 cpm/Öl verdünnt. Proben mit weniger als 100000 cpm wurden als ungeeignet verworfen und entsorgt.

5.2.12 Gelretardations-Assay

Es wurden 511 bp-lange radioaktiv markierte Promotorfragmente (PCR-Produkte von Om01 und ^{32}P -Om09) aus pOM6 verwendet. Für die Bindungsreaktion wurde die DNA in der Stärke von je 25000 cpm pro Ansatz und Proteine in verschiedenen Konzentrationen verwendet: 200 nM- 1600 nM PhoP, 100 nM PhoR231, 20 nM- 40 nM RNAP und 300 nM- 2700 nM AbrB. Um unspezifische Reaktionen zu minimieren wurde 0,1  g/Öl poly(dI-dC) in jeder Reaktion verwendet. Die Bindung erfolgte bei RT für 20 min. Um PhoP zu phosphorylieren wurden die Ansätze zuerst mit PhoR231 und 5 mM ATP für 20 min bei RT inkubiert und danach die DNA zugesetzt. Die Phosphorylierung- und Bindungsreaktion erfolgte im Binding-Puffer. Die Ansätze wurden in 6 %-igen TBE-Acrylgel bei 80 V für 3-4 Stunden getrennt. Die Gele wurden dann 1 h unter Vakuum bei 80°C getrocknet,  N am Phosphorschirm (Kodak) exponiert und im FX-ProPhosphorimager (BioRad) entwickelt.

5.2.13 DNaseI-Footprinting

Die Reaktionen wurden in 50 Öl Volumina angesetzt, die Ansätze enthielten jeweils radioaktiv markierte DNA von 50000 cpm/Öl Stärke. Die Proteinkonzentrationen wurden wie folgt eingesetzt: 0,05  M -1,5  M PhoP, 0,2  M oder 0,4  M PhoR231, 0,02- 0,2  M RNAP. Um PhoP zu phosphorylieren wurden die Ansätze zuerst 20 min bei RT mit 5 mM ATP und PhoR231, ohne RNAP und DNA inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde ebenfalls bei RT für 20 min durchgeführt. Danach wurden die Proben 1 min lang mit 0,005 U DNaseI (verdünnt in DNaseI-Verd nnungslsg) inkubiert, mit 140 Öl DNaseI-Stopppl sung versetzt und mit 300 Öl EtOH (100%) 20 min bei -20°C gefällt. Die gef llte DNA wurden bei 13000 rpm und 4°C pelletiert, mit 70 %-igem EtOH gewaschen und vakuumgetrocknet. Die Pellets wurden in 5 Öl Sequenzierungspuffer aufgenommen und 5 min bei 85°C denaturiert. Danach wurden die gesamten Ansätze in einem 6%igen TBE-Harnstoff-Acrylamidgel bei 50 Watt getrennt. Das Gel wurde auf Whatmann-Papier abgezogen und 1 h unter Vakuum und 80°C getrocknet (Gel Dryer von Biorad). Die Exposition erfolgte auf Kodak MR -Filmen über Nacht bei -80°C und die Entwicklung in X-OMAT (Kodak).

Konzentrationen in der Bindungsreaktion:
1 x Bindungs-Puffer

5 µl	poly dIdC (1 mg/ml)
1 µl	BSA (1 mg/ml)
s.o.	Proteine
50000 cpm	[P ³²]DNA
ad 50 µl	A. bidest

5.2.14 *In vitro* Transkription

Im Vorfeld wurde PhoP phosphoryliert. Dazu wurden 10 µl PhoP mit 1 µl PhoR231 und 1 µl ATP (100 mM) und 4 µl 5x Bindungs-Puffer in 20 µl Gesamtvolumen gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Für die Transkriptionsreaktion wurde DNA verwendet, die mittels PCR mit Om01 und Om09 amplifiziert und mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigt wurde. Die Reaktion wurde mit 100 ng DNA (~10 nM), 1 X Transkriptionspuffer, 0,1 mg/ml poly-dIdC und RNAP in Konzentrationen 30 nM – 120 nM, sowie 60 nM– 300 nM PhoP~P (aus der Phosphorylierungsreaktion) zuerst in 16 µl Volumen angesetzt. Die Ansätze wurden 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Transkription wurde dann mit 4 µl des NTP-Gemisches (0,45 µM UTP, 3 µM ATP/GTP/TTP und 2 µCi [α³²P]UTP) gestartet und lief 20 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit 5 µl Stopp-Solution gestoppt und auf ein 6 %- Harnstoff-Acrylamid-Gel beladen. Der Gellauf wurde mit 50 Watt für ca. 3 Stunden durchgeführt, dann das Gel auf Filterpapier abgezogen, getrocknet und auf einen Kodak-Phosphor-Sceen über Nacht exponiert. Die Detektion erfolgte im X-Pro-Imager (BioRad).

5.2.15 Primerextension

Zuerst wurde der Om09 Primer mit [γ³²P]ATP durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK, Fermentas) nach Herstellerprotokoll phosphoryliert und damit radioaktiv markiert ([P³²]Om09). Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit nach Herstellerprotokoll mit dem ³²P-Om09 Primer angesetzt. Dabei wurde das gereinigte, mit Om01 und Om09 amplifizierte *phyC*-Fragment benutzt. Bei der RT wurde die gesamte RNA von FZB45 (aus LPM-Kultur) verwendet. Die Reaktion wurde ebenfalls mit dem [P³²]OM09-Primer und der M-MuLV-Reversen-Transkriptase (Fermentas) nach dem Protokoll von Fermentas angesetzt. Die Reaktionen wurden in einem 6 %-igen Harnstoff-Acrylamid-Gel bei 60 Watt getrennt, dann das Gel auf Whatmann-Papier abgezogen, getrocknet, auf dem Kodak-Phosphorscreen über Nacht exponiert und in FX-Pro-Plus Imager detektiert.

5.2.16 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

pOM-Plasmide

Für die Konstruktion wurde als Ausgangs-Vektor der pDG268 benutzt, welcher das komplette *lacZ*-Gen besitzt vor dem sich die ‚cloning site‘ befindet und eine Chloramphenicolresistenz. Diese werden von *amy*_{front} - und *amy*_{back} -Regionen eingeschlossen, darüber erfolgte später die Integration ins Genom. Die Inserts wurden in die *EcoRI* und *BamHI* bzw. *HindIII* ‚cloning site‘ ligiert. Dazu wurden diese vorher aus der chromosomale DNA von *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit den Primern Om01 und Om09 bzw. mit Om01 und Om02 aus *Bacillus subtilis* 168 mit der Pfu-Polymerase amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden mit NaAcetat und EtOH gefällt, und anschließend mit den *EcoRI* und *BamHI* bzw. *HindIII* verdaut. Die Ligation wurde mit je 25 ng Vektor und 150 ng Insert durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in DH5α. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Kontrolle mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut. Je ein Klon wurde für die Midi-Plasmidpräparation ausgewählt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Om03 unter Verwendung des Terminator-Kits (General Electrics) sequenziert. (Darstellung des pOM6-Plasmides siehe Abbildung 7.6)

pCUT-Plasmide

Zum Konstruieren der pCUT-Plasmide wurden die Inserts nach der Standard-PCR aus chromosomaler DNA von *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit der Pfu-Polymerase amplifiziert. Für die 5'-Verkürzung wurden dabei als Revers-Primer Om09 und als Vorwärts-Primer Cut1 bis Cut5, für die 3'-Verkürzung der Om01 und Om14 Primer verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gefällt, dann mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in pDG268 ligiert. Die Klonierung wurde in DH5α durchgeführt. Von einigen Transformanten wurden die Plasmide isoliert und mit Om03 sequenziert.

pMUT-Plasmide

Um die pMUT-Plasmide zu erhalten wurde das pOM6-Plasmid mit dem QiuckChange XL-Kit von Stratagene in einer ‚Site directed‘ Mutagenese nach Herstellerprotokoll verändert. Dabei wurden in die Primersequenzen Basensubstitutionen eingeführt und damit das gesamte Plasmid in beide Richtungen (jeweils ein Vorwärts- und Reversprimer) amplifiziert. Die Primer sind der Tabelle 1, die Plasmide der Tabelle 8 zu entnehmen, wo auch die Mutationen aufgelistet sind. Die Bezeichnungen beziehen sich auf die Positionen der Basensubstitutionen. Von einigen *E. coli*-Transformanten wurden die Plasmide isoliert und mit Cy3-Fang3 sequenziert.

pDEL-Plasmide

Um 4 bp Deletionen in dem *phyC*-Promotor einzufügen wurde eine SOE-PCR durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden ebenfalls über Agarose gereinigt, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in pDG268 ligiert. Die Klonierung wurde in DH5 α durchgeführt. Von einigen Transformanten wurden die Plasmide isoliert und mit Cy3-Fang3 sequenziert.

Die Basensubstitutionen wurden dann mit dem QiuckChange XL-Kit von Stratagene in einer ‚Site directed Mutagenese‘ nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Primer sind der Tabelle 1, die Plasmide der Tabelle 9 zu entnehmen.

pPHOP-Plasmid

Die *phoP*-kodierende Region von *B. subtilis* 168 wurde mit den Primern PhoP4 und PhoP5 mit der Taq-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkte wurde mit dem QIAGEN PCR-Purification Kit gereinigt, in pGEMT ligiert und in DH5 α kloniert. Die Transformanten wurden mittels Mini-Präparation und Kontrollrestriktion mit *NdeI* und *XhoI* auf die Richtigkeit der Plasmide überprüft. Anschließend wurde aus einem der positiven Klone das pGEMTphoP-Plasmid in einer Midi-Präparation gewonnen und das *NdeI*/*XhoI*-Fragment ausgeschnitten und über Agarose gereinigt. Das gereinigte Fragment wurde dann in pET15b in die *NdeI* und *XhoI* ‚cloning site‘ ligiert und DH5 α kloniert. Auch hier erfolgte eine Kontrolle der Transformanten mittels Mini-Präparation und *NdeI*/*XhoI*-Restriktion. Aus einer der positiven Transformante wurde das Plasmid in einer Midi-Präparation isoliert und in elektrokompetente *E. coli* BL21 (C43)-Zellen transformiert.

pPHOR231-Plasmid

Aus *B. subtilis* 168 wurde die C-terminale Domäne von PhoR mit den Primern R231For und R231Rev mit der Taq-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkte wurde mit dem QIAGEN PCR-Purification Kit gereinigt, in pGEMT ligiert und in DH5 α kloniert. Die Transformanten wurden nach einer Mini-Präparation mit *NdeI* und *BamHI* auf die Richtigkeit des Inserts überprüft. Anschliessend wurde aus einem der positiven Klone *BsaI*/*XhoI*-Fragment ausgeschnitten, über Agarose gereinigt und in pET28b in die *NcoI* und *XhoI* ‚cloning site‘ ligiert und DH5 α kloniert. Auch hier erfolgte eine Kontrolle der Transformanten mittels Mini-Präparation und *XbaI*/*XhoI*-Restriktion. Aus einer der positiven Transformante wurde das Plasmid in einer Midi-Präparation isoliert und in elektrokompetente *E. coli* BL21 (C43)-Zellen transformiert.

pABRB-Plasmid

Mit den Primern AbrB3 und AbrB4 wurde aus *B. subtilis* 168 mit der Taq-Polymerase die kodierende Region von *abrB* amplifiziert. Das PCR-Produkte wurde mit dem QIAGEN PCR-Purification Kit gereinigt, in pGEMT ligiert und in DH5 α kloniert. Die Transformanten wurden wie oben beschrieben mit *NdeI* und *BamHI* auf die Richtigkeit der Plasmide überprüft. Anschliessend wurde aus einem der positiven Klone mit *NdeI* und *BamHI* das *abrB*-Fragment ausgeschnitten, über Agarose gereinigt und in pET15b in die *NdeI* und *BamHI* ‚cloning site‘ ligiert und in DH5 α kloniert. Auch hier erfolgte eine Kontrolle der Transformanten mittels Mini-Präparation und *NdeI* und *BamHI*-Restriktion. Aus einer der positiven Transformante wurde das Plasmid in einer Midi-Präparation isoliert und in elektrokompetente *E. coli* BL21 (C43)-Zellen transformiert.

OM-Stämme

Die OM-Stämme sind der Tabelle 15 zu entnehmen. Sie wurden generiert durch die Transformation der pDG268-Derivate (pOM6, pOM2 und pCUT-Plasmide) in *Bacillus subtilis* 168 bzw. deren Regulationsmutanten (1A254, 1S13 und GM1038).

MUT-Stämme

Die MUT-Stämme sind ebenfalls der Tabelle 15 zu entnehmen. Sie entstanden durch die Transformation der pMUT-Plasmide in *Bacillus subtilis* 168.

DEL-Stämme

Die DEL-Stämme sind auch in der Tabelle 15 aufgelistet. Sie entstanden durch die Transformation der pDEL-Plasmide in *Bacillus subtilis* 168.

Herstellung der *abrB* und *abrBspoOA*-Mutanten

Da *abrB* Mutanten nicht transformierbar sind, konnte hier pOM6 nicht übertragen werden und. Deshalb wurde in Stamm OM61 die Cm-Resistenz durch die Transformation mit dem Plasmid pECE73 erst mal gegen eine Km-Resistenz ausgetauscht. Der so erzeugte Stamm OM61Km wurde dann mit chromosomaler DNA aus dem Stamm H12586 transformiert. So konnte das *abrB*-Gen durch eine Cm-Resistenz unterbrochen werden. Die gleiche Prozedur wurde auch durchgeführt, um die Doppelmutante *abrBspoOA* zu erhalten. Der Ausgangsstamm hierfür war OM64. Der *abrB::cat*-Phenotyp wurde mittels PCR bestätigt mit den Primerpaar AbrB3 und AbrB4. Das resultierende PCR-Produkt bei positiven Transformanten war um das *cat*-Gen (Cm-Resistenz) größer.

5.3 Sequenzierung von DNA

5.3.1 Sequenzierungsreaktion zur Bestätigung der Genotypen

(nach General Electrics General Electrics Biotech)

Die Reaktionen wurden je nach Bedarf nach folgenden Vorschriften angesetzt:

1. DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit;
2. Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit

Das Gel wurde mit den Repro Gel™-System angefertigt. Die Auftrennung der Sequenzen erfolgte im ALF expressII und die Aufzeichnung im ALFwin™ Sequence Analyser (Version 2.10).

5.3.2 G+A Maxam und Gilbert Sequenzierungsreaktion

Bei dieser Reaktion wurden die Purinbasen zuerst formyliert. Dazu wurde eine Mischung aus 13 µl H₂O und 4 µl radioaktiv markierter DNA (50000 cpm/µl) und 0,5 µl CT-DNA (4 mg/ ml) 5 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte die Zugabe von 5 µl Formiat (4 %) und eine 20 min Inkubation bei 37 °C. Die Proben wurden anschließend mit 200 µl DNaseI-Stopp und 300 µl EtOH (100 %) bei -20 °C übernacht gefällt. Danach wurden die Proben bei 13000 rpm für 20 min zentrifugiert, mit 70 %-igen EtOH gewaschen und weitere 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die DNA vakuumgetrocknet. Die Pellets wurden in 100 µl Piperadin (1 M) aufgenommen und 30 min bei 90 °C inkubiert um formylierten Stellen zu apurinieren und die DNA-Struktur zu brechen. So entsteht eine Sequenzierung der Adenylin und Guanidinreste. Die DNA wurde dann wieder vakuumgetrocknet und die Piperidinreste mit zwei mal 10 µl H₂O gewaschen und getrocknet. Die Pellets wurden in 20 µl Sequenzierungspuffer aufgenommen, 2-3 µl dieser wurden als molekulare Marker für die Footprints verwendet.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Reinigung der Proteine

Reinigung von PhoP

Das *phoP*-Gen wurde N-terminal mit einer His₆-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt (pPHOP) wurde in *E. coli* BL21 (C43) in 2xTBY bei 37 °C und 200 rpm überexprimiert. Die Zellen wurden nach weiteren 4 Stunden Induktion geerntet, im Sonifikationspuffer aufgenommen und aufgeschlossen (5.1.4). Nach Pelletierung der Zelltrümmer wurde der Überstand mit der Ni²⁺-Agarosematrix (Qiagen) für 2 h inkubiert. Gewaschen wurde mit 50 mM Imidazol und eluiert mit 300 mM Imidazol im Sonifikationspuffer.

Ausgewählte Fraktionen wurden in einer SDS-Elektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abbildung 7.4 A). Das His₆-PhoP-Protein besaß die Größe von 30 kDa. Die Dialyse wurde schrittweise gegen Dialysepuffer durchgeführt: erst für 3 Stunden gegen 20 % Glycerin, dann über Nacht gegen 50 % Glycerin. Anschließend wurde der His-Tag über eine Thrombin-Matrix-Säule (Sigma) (5.4.7) streng nach Herstellerprotokoll entfernt. Der Erfolg des Thrombinverdaus wurde im Westernblott bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Stärke der His-Tag-Bande nahm mit Dauer der Inkubation auf der Säule ab, und war bereits nach 6 Stunden nicht mehr zu erkennen. Die Proteinkonzentration wurde mit 72 µg / ml nach Bradford (BioRad) bestimmt. Das entsprach der Konzentration $c = 2,6 \mu\text{M}$.

Reinigung von PhoR231

Die cytoplasmatische, lösliche Domäne von PhoR (pPHOR231) wurde in *E. coli* BL21 (C43) überexprimiert. Nach dem Zellaufschluss und Abtrennung der Zelltrümmer, erfolgte die Reinigung über eine Ni²⁺-Agarosesäule (Qiagen) im B-Puffer. Eluiert wurde mit 300 mM Imidazol im B-Puffer. Ausgewählte Fraktionen wurden in einer SDS-Elektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abbildung 7.4 B). Das PhoR231-Protein besaß die Größe von 42 kDa. Die saubersten Elutionsfraktionen wurde gegen 1 Liter Dialysepuffer über Nacht dialysiert und die Proteinkonzentration mit 170 µg / ml nach Bradford (BioRad) bestimmt. Das entsprach der Konzentration $c = 4 \mu\text{M}$.

Reinigung der RNA-Polymerase

Der *Bacillus subtilis* Stamm MF1 wurde in 2xTBY bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen geerntet, im I-Puffer gewaschen und im 1/100 Volumen I-Puffer aufgenommen und aufgeschlossen. Nachdem die Zelltrümmer pelletiert wurden, erfolgte die Reinigung über eine Ni²⁺-Agarosesäule (Qiagen), gewaschen wurde mit I-Puffer und eluiert mit 100 mM Imidazol im I-Puffer. Da die RNA-Polymerase bereits bei niedrigen Konzentrationen sich von der Matrix löste, waren die Eluate stark mit anderen Proteinen verunreinigt, was in der SDS-PAGE zur erkennen war (Abbildung 7.5 A). Deshalb wurden die Eluate gesammelt und in der Amicon (8050) über ein Filter mit Ausschlussgröße 100 kDa gewaschen, da die RNAP (Holoenzym) eine Größe von 340 kDa besitzt. Dazu wurde die Probe 3 mal mit Dialysepuffer beschichtet. Nach diesem Waschschrift war die Proteinprobe ausreichend sauber (Abbildung 7.5 B). In der SDS-PAGE konnte man die einzelnen Komponenten erkennen: β - und β' -Untereinheiten mit 150 kDa, α - Untereinheit mit 53 kDa und den assoziierten σ^A – Faktor mit 55 kDa. Da die RNAP-Konzentration dieser Reinigung mit 35 µg / ml ($\sim 0,1 \mu\text{M}$) für die *in vitro* Transkription nicht ausreichend war, wurde eine zweite Präparation mit einem größeren Kulturvolumen und einer Einengung von 1/400 im I-Puffer durchgeführt. Hierbei wurden 450 µg / ml ($\sim 1,2 \mu\text{M}$) RNAP gewonnen. Die in der ersten Reinigung gewonnene RNAP, wurde für die EMSA- und Footprintstudien verwendet.

Reinigung von AbrB

Das AbrB-Protein (pABRB) wurde in *E. coli* BL21 (C43) überexprimiert. Nach dem Zellaufschluss und Abtrennung der Zelltrümmer, erfolgte die Reinigung über eine Ni²⁺-TED-Säule (Machery-Nagel) nach Herstellerprotokoll. Dabei wurden die Puffer mit 10 mM β -Mercaptoethanol und 20 % Glycerin versetzt. Ausgewählte Fraktionen wurden in einer SDS-Elektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Daten nicht gezeigt). Das AbrB-Protein besaß die Größe von 11 kDa. Die saubersten Elutionsfraktionen wurden gegen 1 Liter Dialysepuffer über Nacht dialysiert und die Proteinkonzentration mit 37 µg / ml nach Bradford (BioRad) bestimmt. Das entsprach der Konzentration $c = 3,4 \mu\text{M}$. Leider sind während der Dialyse 75 % des Proteins verloren gegangen, möglicherweise hat es an die Membran des Dialyseschlauchs gebunden.

5.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der Proteine wurden mit dem Bradford Reagenz von Roth nach Herstellervorgaben bestimmt. Dazu wurde ein Eichung mit bekannten BSA-Konzentrationen vorgenommen und der Extinktionskoeffizient ermittelt. Gemessen wurde in Ascent-Plattenreader bei 595 nm. Die Differenz der Extinktionen (Probe und Nullwert) wurde durch den Extinktionskoeffizienten geteilt um die Konzentration zu erhalten.

5.4.3 Phosphatbestimmung

Für die Phosphatbestimmung wurden 1ml Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. 100 µl des Überstandes wurden dann mit 400 µl Phytase-Stoppreagenz versetzt (Probe). Dadurch bildeten

sich gelbe Farbkomplexe zwischen freiem Phosphat und dem Vanadat und Molybdat aus, die bei 410 nm gemessen wurden. Dazu wurden je 100 µl der Lösung in Titerplatten gegen den Nullwert, der aus den entsprechenden Verhältnis von A. bidest. und dem Phytase-Stoppreeagenz bestand. Die Differenz der Extinktionen wurde gebildet und die Konzentration an Hand eines Extinktionskoeffizienten aus der Eichreihe mit bekannten Phosphatkonzentrationen wie folgt errechnet:

$$C = (E_{\text{Probe}} - E_{\text{Nullwert}}) / \epsilon$$

5.4.4 Enzym-Assays

β-Galaktosidase-Assay

(Modifiziert nach Miller, 1977)

100 µl Zellsuspensionen (Kultivierung 0) wurden im 800 µl Z-Puffer aufgenommen und bei 30°C für 10 min inkubiert. Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl ONPG gestartet, und lief bei 30°C. Gestoppt wurden die Reaktion mit 400 µl Na₂CO₃ (1 M) nach dem eine gelbliche Färbung auftrat. Die Zelltrümmer wurden bei 13000rpm für 2 min zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 420 nm und die Trübung bei 550 nm gemessen. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller Units angegeben:

$$MU = 1000 * (E_{420} - 1,755 * E_{550}) / (t * V * OD_{600})$$

APase-Assay

80 µl Zellsuspensionen (Kultivierung 0) wurden im 300 µl APase-Puffer aufgenommen und bei 30°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl PNPP gestartet, und lief bei 30°C. Beim Auftreten einer Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl NaOH (2 M) gestoppt. Die Zelltrümmer wurden bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 410 nm gemessen. Die APase-Aktivität wurde in Units angegeben:

$$U = (E_{410} * 235 * V_{\text{gesamt}}) / (t * V_{\text{Probe}} * OD_{600})$$

Phosphorylierungsassay von PhoP

Die Phosphorylierung von PhoP wurde in einem 80 µl Ansatz in 1 x Bindungs-Puffer angesetzt. Dabei wurden 1,2 µg PhoR231 mit 8 µl [³²P] ATP (5 mM) versetzt und 5 min bei RT inkubiert (Autophosphorylierung). Danach wurde die Transphosphorylierung mit 1,2 µg PhoP gestartet und in Abständen von 10 s, 30 s und 90 s Proben von 20 µl entnommen und mit SDS-Ladepuffer die Reaktionen gestoppt. Als Kontrolle wurden 0,3 µg PhoR231 und 0,3 µg PhoP unter gleichen Bedingungen in 20 µl Volumen 90 s inkubiert. Alle Proben wurden anschließend in einer SDS-PAGE getrennt. Die Gele wurden getrocknet, dann auf einem Kodak-Phosphor-Screen exponiert und die Images im Molecular Imager FX-Pro plus (Biorad) entwickelt.

5.4.5 SDS-PAGE

Die SDS-Gele wurden mit Tris-Glycin-Puffer (TG-Puffer) nach Maniatis angefertigt. Für die Elektrophorese von PhoP und PhoR wurden 12 %-ige Gele, für AbrB 14 %-ige Gele und für RNAP 10 % Gele benutzt. Die Elektrophorese wurde bei 150 bis 200 Volt durchgeführt. Die Gele wurden Anschliessend 10 min im Entfärberlösung gewaschen, dann 20 min in der Färbelösung gefärbt und im Entfärber so lange entfärbt bis die Banden gut erkennbar waren.

5.4.6 Western-Blot

Nach der SDS-Elektrophorese wurden die Gele 15 min im Blotting-Puffer gewaschen. Zwei Whatmann-Papierstücke und die Nitrozellulose-Membran (Machery Nagel) wurden ebenfalls in Blotting-Puffer äquilibriert. Anschliessend wurden die Gele auf die Membran zwischen dem Whatmann-Papier in Semi-Dry-Botter (Biorad) für 20 min bei 15 Volt geblottet. Die Membran wurden 1 h im 5 %-iger Magarmilch-TBST-Lösung geblockt, dann wurde der His-Tag-Antikörper (Santa Cruz) zu einer Verdünnung von 1:20 000 zugegeben. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C.

Danach wurden die Membran 2 mal für 20 min mit TBST gewaschen und 1 Stunde mit dem 2. Antikörper (Anti-Kaninchen IgG) im TBST inkubiert. Nach nochmaligen Waschen wurde die Membran mit 10 ml AP-Puffer + 50 µl BCIP + 50 µl NBP entwickelt. Die Reaktion wurde mit 10 TE-Puffer gestoppt.

5.4.7 Thrombinverdau zur Entfernung des His-Tag

Um das His-Tag von PhoP zu entfernen wurde das **ThrombinCleavage-Kit** von **Sigma** nach Herstellervorgaben verwendet.

5.5 Software

- Der Text wurde im **Microsoft Word2000** verfasst, die Diagramme und Tabellen wurden im **Microsoft Excel2000** angefertigt.
- Die digitale Bilddokumentation und Auswertung wurden mit dem **SynGene** von **Merck** durchgeführt. Radioaktive Images wurden mit **QuantityOne** (BioRad) ausgewertet. Weiter Bildbearbeitung erfolgte im **CorelPHOTO-PAINT10**, **PhotoImpactSE** und **Adobe Photoshop6**.
- Graphische Darstellungen wurden im **Microsoft Excel2000** und **CorelDRAW10** erstellt.
- Die Auswertung der Sequenzen und Anfertigung der Alignments erfolgte im **DSGene**, sowie über **NCBI Blast** (www.ncbi.gov.com) und **ClustalW** (www.ebi.ac.uk/clustalw).

6 Referenzen

- Abdel-Fattah, W. R., Y. Chen, A. Eldakak, Hulett, F. M. (2005) *Bacillus subtilis* phosphorylated PhoP: direct activation of the EoA- and repression of the EoE-reponsive *phoB*-PS+V promoters during Pho response. *J. Bacteriol.* **187**: 5166-5178.
- Antelmann, H., Scharf, C., and Hecker, M. (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: Proteomics and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* **182**: 4478-4490.
- Antoniewski, C., Savelli, B., Stragier, P. (1990) The *spoIIJ* gene, which regulates early developmental steps in *Bacillus subtilis*, belongs to a class of environmentally responsive gens. *J. Bacteriol.* **172**: 86-93.
- Atlung, T., Brøndsted, L. (1994) Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase. *J. Bacteriol.* **176**: 5414-5422.
- Baldus, J.M., Green, B.D., Youngman, P, Moran, C.P., Jr. (1994) Posphorylation of *Bacillus subtilis* transcription factor SpoOA stimulates transcription from the *spoII*G promoter by enhancing binding to weak OA boxes. *J. Bacterion.* **17**: 296-306.
- Baten, A., Ullah, A., Tomazic, V.J., Shamsuddin, A.M. (1989) Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression. *Carcinogenesis.* **10 (9)**: 1595–1598.
- Benson, L.M., Vaughn, J.L., Strauch, M.A., Bobay, B.G., Thompson, R., Naylor, Cavanagh, S., J. (2002) Macromolecular assembly of the transition state regulator AbrB in its unbound and complexed states probed by microelectrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **306**: 222–227.
- Berridge, M. J. Irvine, R. F. (1984) Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* **312**: 315-321.
- Blencke, H.-M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M., Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.* **5**: 133–149.
- Bobay, B.G., Benson, L., Naylor, S., Feeney, B., Clark, A.C., Goshe, M.B., Strauch, M.A., Thompson, Cavanagh, R., J. (2004) Evaluation of the DNA binding tendencies of the transition state regulator AbrB. *Biochemistry.* **43**:16106–16118.
- Boylan, S. A., Redfield, A. R., Brody, M. S., Price, C. W. (1993) Stressinduced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 7931–7937.
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Yehuda, S. B, Losick, R., Kolter, R. (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:11621–11626.
- Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick ,R., Grossman, A. D. (2002) Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**: 4881–4890.
- Brookstein, C., Edwards, C. W., Kapp, N. V., Hulett, F. M. (1990) The *Bacillus subtilis* 168 alkaline phosphatase III gene: impact of a *phoAIII* mutation on total alkaline phosphatase synthesis. *J. Bacteriol.* **172**: 3730-3737.
- Broz, J., Oldale, P., Perrin-Voltz, A. H., Rychen, G., Schlze, J., Simoes Nunes, C. (1994) Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Br. J. Poultry Sci.* **35**: 273-280.
- Brune, M., Rossander-Hulthén, L., Hallberg, L., Gleerup, A., Sandberg, A.-S. (1992) Iron absorption from bread in humans: Inhibiting effects of cereal fiber, Phytat and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.* **122**: 442-449.
- Burbulys, D., Trach, K. A., Hoch, J. A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* **64**(3): 545-552.
- Cavanagh, J., Thompson, M., Bobay, B., Benson, L. M., Naylor, S. (2002) Stoichiometries of protein-protein/DNA binding and conformational changes for the transition-state regulator AbrB measured by pseudo cell-size exclusion chromatography-mass spectrometry. *Biochemistry* **41**: 7859 -7865,.

- Chen, Y., Abdel-Fattah, W. R., Hulett, F. M. (2004) Residues required for *Bacillus subtilis* PhoP DNA binding or RNA Polymerase interaction: Alanine screening of PhoP effector domain transactivation loop and α helix 3. *J. Bacteriol.* **186**: 1493-1502.
- Cheng, C., Lim, B. L. (2006) Beta-propella phytases in the aquatic environment. *Arch. Microbiol.* **185**: 1-13.
- Chesnut, R. S., Brookstein, C., Hulett, F. M. (1991) Separate promoters direct expression of *phoAIII*, a member of the *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase multigene family, during phosphate starvation and sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**: 2181-2190.
- Chibazakura, T., Kawamura, F., Takahashi, H. (1991) Differential regulation of *spoOA* transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.* **173**: 2625-2632.
- Common, F. H. (1989) Biological availability of phosphorus for pigs. *Nature.* **143**: 370-380.
- Cosby, W., Zuber, P. (1997) Regulation of *Bacillus* σ^H (Spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *J. Bacteriol.* **179**: 6778-6787.
- Dassa, J., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kiefer-Bontemps, M., Boquet, P. L. (1991) A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Mol. Gen. Genet.* **229**: 341-352.
- Dassa, J., Marck, C., L. Boquet, P. (1990) The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J. Bacteriol.* **172**: 5497-5500.
- de Hoon, M. J. L., Makita, Y., Nakai, K., Miyano, S. (2005) Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLOS Computational Biology.* **1**: 212-221.
- Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., Hillen, W. (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 1049-1053.
- Eder, S., Liu, W., Hulett, F. M. (1999) Mutational analysis of the *phoD* promoter in *Bacillus subtilis*: implications of the PhoP binding and promoter activation of Pho regulon promoters. *J. Bacteriol.* **181**: 2017-2025.
- Eder, S., Shi, L., Jensen, K., Yamane, K., Hulett, F. M. (1996) A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/phosphatase is the product of a Pho regulon gene. *Microbiol.* **142**: 2041-2047.
- Efanov, A.M., Zaitsev, S.V., Berggren, P.O. (1997) Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primes Ca²⁺-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 4435-4439.
- Errington, J., Vogt, C. H. (1990) Isolation and characterization of mutations in the gene encoding an endogenous *Bacillus subtilis* beta-galactosidase and its regulator. *J. Bacteriol.* **172**: 488-90.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., Chen, Z. W. S., Niu, W., Ebright, R. H., Gourse, R. L. (1999) Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α -subunit. *Genes Dev.* **13**: 2134-2147.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R. L. (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 9761-9766.
- Findenegg, G. R., Nelemans, J. A. (1993) The effect of phytase on the availability of phosphorus from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant. Soil.* **154**: 189-196.
- Fisher, S. H., Strauch, M. A., Atkinson, M. R., Wray Jr., L. V. (1994) Modulation of *Bacillus subtilis* catabolite repression by transition state regulatory protein AbrB. *J. Bacteriol.* **176**: 1903-1912.
- Fude, Y., Strauch, M. A. (2005) Independent and interchangeable multimerization domains of the AbrB, Abh, and SpoVT global regulatory proteins. *J. Bacteriol.* **187**: 6354-6362.
- Fujita, M., Sadaie, Y. (1998) Rapid isolation of RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Gene.* **221**: 185-190.
- Furbass, R., Marahiel, M. A. (1991) Mutant analysis of interaction of the *Bacillus subtilis* transcription regulator AbrB with the antibiotic biosynthesis gene *tycA*. *FEBS Lett.* **287**: 153-160.

- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J. Martin-Verstraete, I. (1997). The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in catabolite repression. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 8439–8444.
- Gaur, N. K., K. Cabane, Smith, I. (1988) Structure and expression of the *Bacillus subtilis* *sin* operon. *J. Bacteriol.* **170**:1046–1053.
- Greiner, R., Carlsson, N., Alminger, M. L. (2001) Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **84**: 53-62.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., Jany, K.-D. (1997) Purification and characterization of Phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. & Biophys.* **341**: 201-206.
- Grossman, A. D. (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 477-508.
- Gruber, T.M., Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:441–66.
- Guofu, S. Birkley, S. M., Hulett, F. M. (1996) Tree two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 941-948.
- Guzman, P., Westpheling, J., Youngman, P. (1988) Characterization of the promoter region of the *Bacillus subtilis* *spoII*E operon. *J. Bacteriol.* **170**: 1598- 1609.
- Ha, N.-C., Oh, B.-C., Shin, S., Kim, H.-J., Oh, T.-K., Kim, Y.-O., Choi, K.-Y., Oh, B.-H. (2000) Crystal structures of a novel, thermostable Phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nature Structural Biol.* **7**: 147-153.
- Hahn, J., M. Roggiani, Dubnau, D. (1995) The major role of Spo0A in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene. *J. Bacteriol.* **177**:3601–3605.
- Haldenwang, W. G. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**: 1-30.
- Hamoen, L. W., Kausche, D., Marahiel, M. A., van Sinderen, D., Venema, G., Serror, P. (2003) The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the 335 promoter region of *comK*. *FEMS Microbiol. Letters.* **218**: 299-304.
- Hamon, M. A., N. R. Stanley, R. A. Britton, A. D. Grossman, Lazazzera, B. A. (2004) Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **52**:847–860.
- Haros, M., Bielecka, M., Sanz, Y. (2005) Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**: :231-239.
- Harwood, T. R., Cutting, M. (1990) Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons.
- Heaney, R. P., Weaver, C. M., Fitzsimmons, M. L. (1991) Soybean Phytat content: effect on calcium absorption. *J. Clin. Nutr.* **53**: 745-747.
- Hecker, M. Völker, U. (1990) General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 197–214.
- Hecker, M. Völker, U. (1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of σ^B regulon. *Mol. Microbiol.* **29**: 1129-1136.
- Hughes, K.T., Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 231–86.
- Hulett, F. M. (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 933-939.
- Hulett, F. M., Kim, E. E., Bookstein, C., Kapp, N. V., Edwards, C. W., Wyckoff, H. W. (1991) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatases III and IV. Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure. *J. Biol. Chem.* **266**: 1077–1084.
- Hulett, F. M., Lee, J., Shi, L., Sun, G., Chesnut, R., Sharkova, E., Duggan, M. F., Kapp N.. (1994). Sequential action of two-component genetic switches regulates the Pho regulon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**: 1348-1358.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, B., Richter, R., Borriss, R. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiol.* **148**: 2097–2109.

- Ionesco, H., Michel, J., Cami, B., Schaeffer, P. (1970) Genetics of sporulation in *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Appl. Bacteriol.* **33**: 13-24.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., Hoch, J.A. (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **38**: 535-542.
- Kapp, N. V., Edwards, C. W., Chesnut, R. S., Hulett, F. M. (1990) The *Bacillus subtilis* *phoAIV* gene: effects of *in vitro* inactivation on total alkaline phosphatase production. *Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1784-1788.
- Keilty S, Rosenberg M. (1987) Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J Biol Chem.* 1987 **262** (13): 6389–6395.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J. (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (6) : 2079-2085.
- Kim, Y.O., Lee, J.K., Kim, H.K., Yu, J.H., Oh, T.K. (1998) Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162** (1): 185-191 .
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H.; Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* **186**: 1084-1096.
- Kumar, A., Buckner Starke, C., DeZalia, M., Moran Jr., C.P. (2004) Surfaces of Spo0A and RNA Polymerase sigma factor A that interact at the *spolIG* promoter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**: 200-206.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Danchin, A., et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390** : 249-256.
- Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W., Jia, Z. (2000) Crystal structure of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nature Structural Biology.* **7**: 108-113.
- Liu, W., Hulett, M. (1997) *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J. Bacteriol.* **179**: 6302-6310.
- Liu, W., Hulett, M. (1998). Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site. *Microbiology.* **144**: 1443–1450.
- Liu, W., Qi, Y., Hulett, M. (1998a) Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol. Microbiol.* **28**: 119-130.
- Liu, W., S. Eder, Hulett, F. M. (1998b). Analysis of *Bacillus subtilis* *tagAB* and *tagDEF* expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P. *J. Bacteriol.* **180**: 753-758.
- Lönnerdal, B., Bell, J. G., Hendricks, A. G., Burns, R. A. (1988) Effect of Phytate removal on zinc absorption from soy formula. *Am. J Clin. Nutr.* **48**: 1301-1306.
- Marahiel, M. A., M. M. Nakano, Zuber, P. (1993) Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **7**:631–636.
- Mega, J. A. (1982) Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significans and methods of analysis. *J. Agric. Foot Chem.* **30**:1-9.
- Miller, J. H. (1977) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mirel, D. B., Estacio, W. F., Mathieu, M., Olmsted, E., Ramirez, J. Márquez-Magaña, L. M. (2000) Environmental regulation of *Bacillus subtilis* σ^D -dependent gene expression. *J. Bacteriol.* **182**: 3055–3062.
- Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B., Pasamontes, L., van Loon, A. P. G. M. (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology.* **143**: 245–252.
- Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M., Fujita, Y. (2000) Evaluation and characterization of cataboliteresponsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **28**: 1206–1210.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu J.S., Losick, R. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **50** (5): 1683–1701.

- Moreno, S. M., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W., Saier, M. H. Jr. (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel Models of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol. Microbiol.* **39**: 1366-1381.
- Msadek, T. (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signalling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **7**: 201-207.
- Mullaney, E. J., Ullah, A. H. (2003) The term phytases comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**: 179-184.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K.-I., Fujita, Y., Tanaka, T. (2001) DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component systems. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3804-3813.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., van Loon, A. P. G. M. (1997) Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1696-1700.
- Pen, J., Verwoerd, T. C., Van Paridon, P. A., Beudeker, R. F. (1993) Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio. Technology* **11**: 811-814.
- Perego, M., Hoch, J. A. (1991) Negative regulation of *Bacillus subtilis* sporulation by the *spoOE* gene product. *J. Bacteriol.* **173**:2514-2520.
- Perego, M., Spiegelman, G. B., Hoch, J. A.. (1988) Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spoOA* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2**: 689-699.
- Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Volker, Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**: 5617-5631.
- Phillips, Z. E., and M. A. Strauch. (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:392-402.
- Piggot, P. J. (1973) Mapping of asporogenous mutations of *Bacillus subtilis*: A minimum estimate of the number of sporulation operons. *J. Bacteriol.* **114**: 1241-1253.
- Piggot, P.J., Losick, R. (2002) Sporulation genes and intercompartment regulation. In *Bacillus subtilis and its closest Relatives: from Genes to Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch,J.A., Losick,R. (Eds). American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 483-517.
- Predich, M., Nair, G., Smith., I. (1992) *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spoOF*, and *spoOA* are transcribed by the RNA polymerase containing sigma H. *J. Bacteriol.* **174**: 2771-2778.
- Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy, Youngman, P. (2001) Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **41**: 757-774.
- Puri-Taneja, A., Paul, S., Chen, Y., Hulett, F. M. (2006) CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, *P_{AB}*. *J. Bacteriol.* **188**: 1266-1278.
- Qi, Y., Kobayashi, Y., Hulett, F. M. (1997) The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the Pho regulon. *J. Bacteriol.* **179**: 2534- 2539.
- Reddy, N. R., Sathe, S. K., Salunkhe, D. K. (1982) Phytats in legumes and cereals. *Adv. Food Chem.:* 1-92.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can. J. Microbiol.* **43**(6): 509-516.
- Roels, S., Losick, R. (1995) Adjacent and divergently oriented operons under the control of the sporulation regulatory protein GerE in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **177** (21): 6263-75.
- Saile, E., Koehler, T. M. (2002) Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator *abrB*. *J. Bacteriol.* **184**:370-380.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. Laboratory manual, 2. Edition. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sandberg, A. S., Hulthen, L. R., Turk, M. (1996) *Aspergillus niger* Phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* **126**: 476-480.

- Sasakawa, N., Sharif, M. Hanley, M.R. (1995) Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphates and inositol hexakisphosphate. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 137–146.
- Shamsuddin, A.M. (2002) Anti-cancer function of phytic acid. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**: 769–782.
- Shamsuddin, A.M., Vucenik, I. Cole, K.H. (1997) IP₆: a novel anticancer agent. *Life Sci.*, **61**, 343–354.
- Shin, S., Ha, N.-C., Oh, B.-C., Oh, T.-K., Oh, B.-H. (2001) Enzyme Mechanism and Catalytic Property of β Propeller Phytase. *Structure*. **9**: 851-858.
- Siren, M., Linne, L., Persson, L. (1991) Pharmacological effects of D-*myo*-inositol-1,2,6-trisphosphate. In: Inositol Phosphates and Derivatives. Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential. Reitz, A.B. (Ed.). American Chemical Society, Washington DC, pp: 103–110.
- Steinmetz, M., Richter, R. (1994) Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination *Gene*. **142**: 79-83.
- Strauch, M. A. (1995) AbrB modulates expression and catabolite repression of a *Bacillus subtilis* ribose transport operon. *J. Bacteriol.* **177**: 6727–6731.
- Strauch, M. A., Spiegelman, G. B., Perego, M., Johnson, W. C., Burbulys, D., Hoch, J. A. (1989a) The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA-binding protein. *EMBO J.* **8**: 1615–1621.
- Strauch, M.A. (1993) Regulation of *Bacillus subtilis* gene expression during the transition from exponential growth to stationary phase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **46**: 121-153.
- Strauch, M.A. (1999) AbrB, a transition state regulator. In *Bacillus subtilis and Other Grampositive Bacteria*. Sonenshein, A.L. et al., (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, pp: 757-764.
- Strauch, M.A., Perego, M., Burbulys, D., Hoch, J.A. (1989b) The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. *Mol. Microbiol.* **3**: 1203-1209.
- Strauch, M.A., Webb, V., Spiegelman, G., Hoch, J.A. (1990) The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1801-1805.
- Stülke, J., Hillen, W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiol.* **2**:195-201.
- Sun, G., Birkey, S.M., Hulett, F.M. (1996) Three twocomponent signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **19**: 941–948.
- Torre, M., Rodrigues, A. R., Saura-Calixto, F. (1991) Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1**: 1-22.
- Touati, E. und Danchin, A. (1987) The structure of the promoter and amino terminal region of the pH 2.5 acid phosphatase structural gene (*appA*) of *E. coli*: a negative control of transcription mediated by cyclic AMP. *Biochimie.* **69**: 215-221.
- Vaughn, J. L., Feher, V. A., Bracken, C., Cavanagh, J. (2001) The DNA-binding domain in the *Bacillus subtilis* transition-state regulator AbrB employs significant motion for promiscuous DNA recognition. *J. Mol. Biol.* **305**: 429–439.
- Vaughn, J. L., Skelton, N., Feher, V. A., Naylor, S., Strauch, M. A., Cavanagh, J. (2000) Novel DNA recognition topology and gene regulation Model for transition-state regulators. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1139-1146.
- Voelker, U., A. Voelker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour, Haldenwang. W. G. (1995) Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177** :3771–3780.
- Voskuil, M. I., Chambliss, G. H. (1998) The –16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3584–3590.
- Voskuil, M. I., Voepel, K., Chambliss, G. H. (1995) The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **17** (2): 271-279.
- Weir, J., Predich, M., Dubnau, E., Nair, G., Smith, J. (1991) Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *Bacillus subtilis* σ^H factor. *J. Bacteriol.* **173**: 521–529.
- Wodzinski, R. J., Ullah, A. H. J. (1996). Phytase. *Adv Appl Microbiol.* **42**: 263-302.

- Wyss, M., Pasamontes, L., Rémy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Müller, F., van Loon, A. P. G. M. (1998) Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *App. Environ. Microbiol.* **64**: 4446–4451.
- Xu, K. Strauch, M.A. (2001) DNA-binding activity of aminoterminal domains of the *Bacillus subtilis* AbrB protein. *J. Bacteriol.* **183**, 4094–4098.
- Xu, K., Clark, D., Strauch, M. A. (1996) Analysis of *abrB* mutations, mutant proteins, and why *abrB* does not utilize a perfect consensus in the -35 region of its σ^A promoter. *J. Biol. Chem.* **271**: 2621–2626.
- Xu, K., Strauch, M. A. (1996) *In vitro* selection of optimal AbrB-binding sites: comparison to known *in vivo* sites indicates flexibility in AbrB binding and recognition of three-dimensional DNA structures. *Mol. Microbiol.* **19**: 145-158.
- Yanke, L. Y., Bae, H. D., Selinger, L. B., Cheng, K.-J. (1998) Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiol.* **144**: 1565-1573.
- Yoon, S.-J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H. (1996), Isolation of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 449-454.
- York, K., Kenney, T. J., Satola, S., Moran, Jr. C.P., Poth, H., Youngman, P. (1992) Spo0A controls the σ^A dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spolIE*. *J. Bacteriol.* **174**: 2648-2658.
- Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C. M., Matsunaga, M., Yanaguchi, H, et al. (2001) Combined transcriptom and proteom analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **29**: 683-692.
- Yoshida, K.-C., Yamamoto, Y., Omae, K., Yamamoto, M., Fujita, Y. (2002) Identification of two myo-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184** (4): 983–991.
- Yoshida, K.-I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T., Fujita, Y. (1997) Organisation and Transcription of the myo-Inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**(14): 4591-4598.
- Yoshida, K.-I., Shibayama, T., Aoyama, D., Fujita, Y. (1999) Interaction of a Repressor and its Binding Sites for Regulation of the *Bacillus subtilis* *iol* Divergon. *J. Mol. Biol.* **285**: 917-929.
- Zamudio, M., González, A., Medina, J.A. (2001) *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to a non-specific acid phosphatase. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 181–184.
- Zuber, P., Losick R. (1987) Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**:2223–2230.

7 Anhang

7.1 Weitere Abbildungen

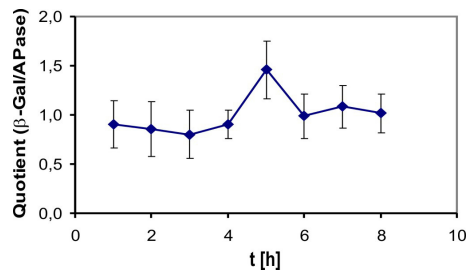


Abbildung 7.1: **Das Verhältnis der Enzymaktivitäten β -Galaktosidase [MU]/APase [U]**; Wie man erkennen kann lag das Verhältnis der beiden Enzymaktivitäten meist bei 1, nur während der transienten Phase (4. bis 6. Stunde) stieg die β -Galaktosidase-Aktivität um das 1,5-fache der APase-Aktivität an.

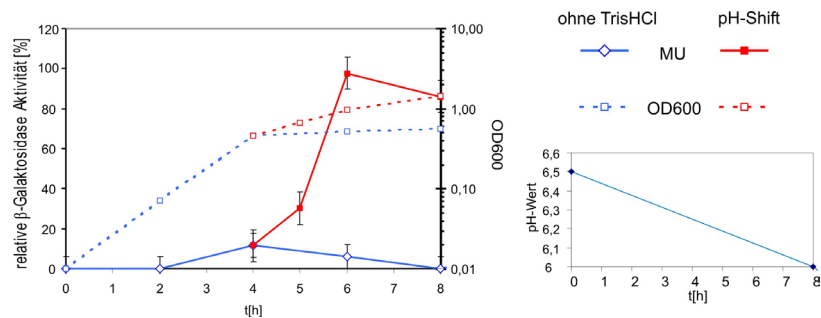
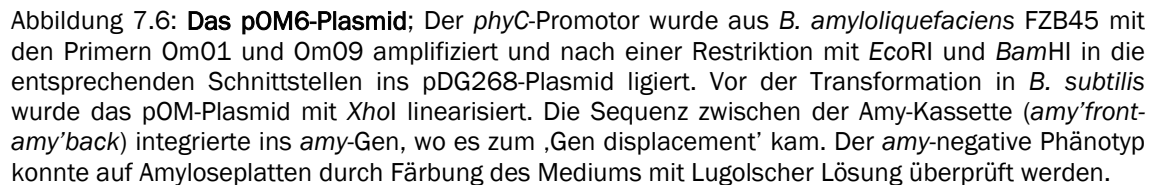
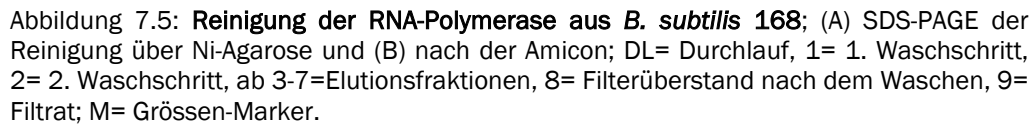
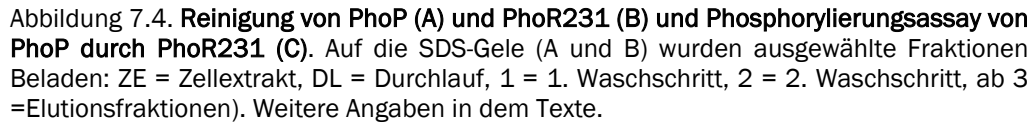


Abbildung 7.2: **pH-Shift**; Eine ungepufferte LPM-Kultur wurde bis zum Erreichen der transienten Phase angezogen, dann wurde eine Hälfte in ein gepuffertes Medium (pH-Shift) umgesetzt und die andere Hälfte unverändert weiter inkubiert. Wie der linken Abbildung zu entnehmen ist, stieg die β -Galaktosidase-Aktivität in der ‚geshifteten‘-Kultur sofort an, während sie in der ungepufferten Kultur fiel. In der Rechten Abbildung ist die Veränderung des pH-Wertes in dem ungepufferten Medium dargestellt. Nach 8 Stunden ist dieser um 0,5 pH-Einheiten (von pH 6,5 auf pH 6) gefallen.

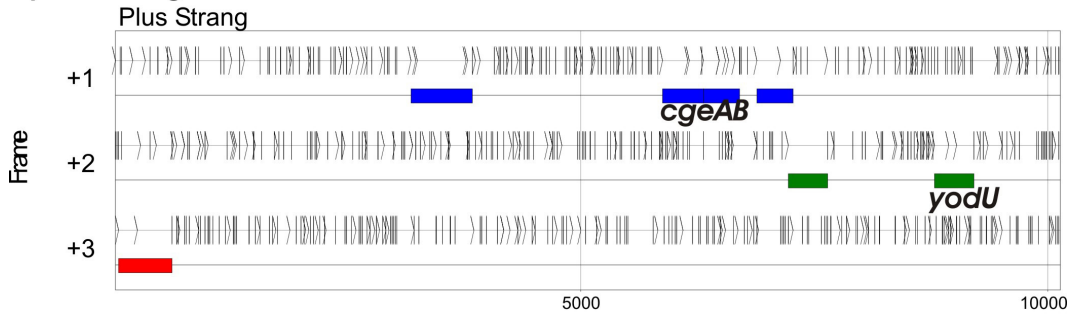
PhoP-P: / 60 120 240 480 nM
 RNAP : 0,3 0,3 0,3 0,3 0,3 U



Abbildung 7.3: **In vitro Transkription von *phyC* durch die *E. coli* RNA-Polymerase** (Holoenzym, σ^{70} -gesättigt); Im Gegensatz zur *B. subtilis* RNAP konnte mit der *E. coli* RNA-Polymerase auch in Abwesenheit von PhoP~P ein Transkript erzeugt werden. PhoP~P-Anwesenheit erhöhte die Transkriptrate auch hier bei niedrigen Konzentrationen (60 nM), höhere PhoP~P-Konzentrationen (ab 120 nM) konnten hier ebenfalls die Transkription auf einem konstanten niedrigeren Level halten.



Open Reading Frames:



Open Reading Frames:

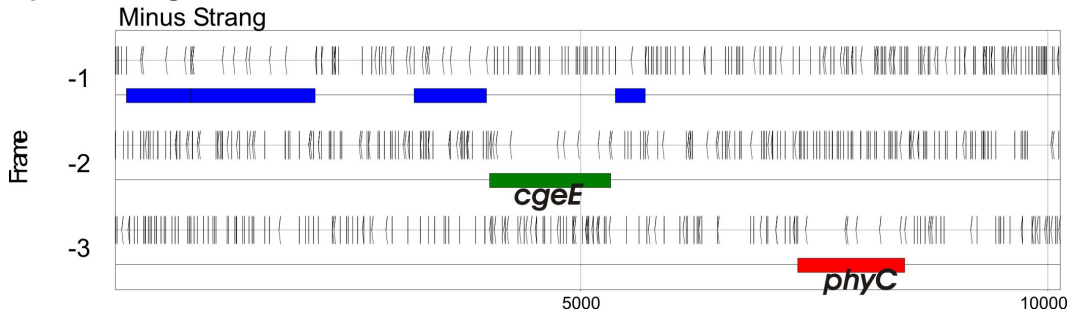


Abbildung 7.7: Die Umgebung von *phyC* aus *B. amyloliquefaciens* FZB42. Die Analyse der ORFs beider Stränge wurde in DS Gene erstellt.

7.2 Alignments

7.2.1 CLUSTAL W (1.82) Multiples Sequenz-Alignment

	168 BS	AF029053 BS	AF453255 BA	U85968 Bsp	FZB45 BA	FZB42 BA
AF029053 BS	66					
AF453255 BA	67	96				
U85968 Bsp	67	92	91			
FZB45 BA	59	90	90	97		
FZB42 BA	59	91	90	97	97	
AF469936 BL	48	63	66	53	56	55

Abbildung 7.8: Paarweises Alignment; BS = *Bacillus subtilis*, BA = *Bacillus amyloliquefaciens*, Bsp = *Bacillus* sp., BL = *Bacillus licheniformis*

Sequence 1: 168_BS 1847 bp
 Sequence 2: AF029053_BS 1290 bp
 Sequence 3: AF453255_BA 1417 bp
 Sequence 4: U85968_DS11 1677 bp
 Sequence 5: FZB45_BA 1658 bp
 Sequence 6: FZB42_BA 1703 bp
 Sequence 7: AF469936_BL 1473 bp

```

FZB45_BA -----AAACGGTTGTAGCTCTACTGCTTGCTGTTTA 32
FZB42_BA CCTGTGACGAGAACAGTTTTATCGTGAAAAACGGTTGTAGCTCTACTGCTTGCTGTTTA 60
U85968_DS11 -----
AF029053_BS -----
AF453255_BA -----
168_BS CCAGTGACTAAACTGTTTTGTTATGGAAAAATGGTTTTAGTTCTGCTGTTTGCTGTTTA 60
AF469936_BL -----
    
```

ANHANG

	← Met	
FZB45_BA	GGCATGGCTTATCCTCCAACCTCTCGTTTCTTACCATGCATCATATGTTGAACAATTTCA	92
FZB42_BA	GGCATGGCTTATCCTCCAACCTCTCGTTTCTTACCATGCATCATATGTTGAACAATTTCA	120
U85968_DS11	-----CATATGTTGAACAATTTCA	19
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	-----	
168_BS	GGCATGGCTTATCCTCCAACCTCTCGTTTCTTACCATGCATCATATGTTCAACTTTGTAA	120
AF469936_BL	-----CCTGAAGTGACTTATCAAAAAGTATATCAATGGATCAAAGATCAAGGTCTTCGT	54
FZB45_BA	GCGAGTTAATGAAAGAAACCAATAAATCAAAAATTA---GAGAAA--AACAT-TAATCTG	146
FZB42_BA	GCGAGTTAATGAAAGAAACCAATAAATCAAAAATTA---GAGAAA--AACAT-TAATCTG	174
U85968_DS11	GCGAGTTAATGAAAGAAACCAATAAATCAAAAATTA---GAGAAA--AACAT-TAATCTG	73
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	GCGAGTTAATGAAAGAAACCAATAAATCAAAAATTA---GAGAAA--ATCAT-TAATCTG	54
168_BS	TCGAATTAATGAAAGCAACCAATAAACAATAATTTA---GGGAATGATCATGTACAAA	177
AF469936_BL	TTAAATTG-TGACGCTTTTACACAATTGGAATTTTACCCGATGGATGGGGATTTAAACGA	113
	cre?	
FZB45_BA	ATGCGCTTTTCATATCGCTTTTATCCGA-----TTAATAGAATAGAA-ATCACAAATA	196
FZB42_BA	ATGCGCTTTTCATATCGCTTTTATCCGA-----TTAATAGAATAGAA-ATCACAAATA	224
U85968_DS11	ATGCGCTTTTCATATCGCGTTTACCCGA-----TTAATAGAATAGAA-ATTACAAATA	123
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	ATGCGCTTTTATTCGCTTTTACTTGA-----TTAATAGAAAGTAA-ATTACTAACA	104
168_BS	GTGTTCTTTTTTAATAGAAAAACGAAACGACGTAAGTGGGAAAAACAAACTAAAT	237
AF469936_BL	ACTTGCGTTTGAGATATACATTCCGAT-----TCATTGAGAGATAGCGATGTTAAAG	165
	cre?	
FZB45_BA	AAACATTGTACTAAATATTCA-----TTTTAAAT-----ATTTGCTCA	238
FZB42_BA	AAACATTGTACTAAATGTTCA-----TTTTAAAT-----ATTTGCTCA	262
U85968_DS11	AAACATTGTACTAAATATTCA-----TTTTAAAT-----ATTTGCTCA	161
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	AAACAATGTACTAAATATTCA-----TTTATAAT-----TTTGCTCC	141
168_BS	AAATAATGTACTAAATATTCAACATATTTTTATTTTCGCTCCGCAAAAGTAAATCTGGCAA	297
AF469936_BL	GCAGCCCCGGAAAAAATCCGGGGGTTTTCTTTGGGTTT-----CGTACTCT	213
	PhoP	
FZB45_BA	CGTCAATTTTTT--TTCTCC---GTAAATCTCACATGCGG-ACAATCTTCACAAAAA-	286
FZB42_BA	CGTCAATTTCTT--CTCTTC---ATAAATCTCACATGCGG-ACAATCTTCACAAAAA-	314
U85968_DS11	CGTCAATTTTTT--CTCTTC---ATAAATCTCACATTCGG-ACAATCTTCACAAAAA-	213
AF029053_BS	-----CACATTTG--ACAATTTTCACAAAAA-	24
AF453255_BA	CGTCCTTTTTTC--TTCCTCCATCAAAAATTTACACATTCG--ACAATTTTCACAAAAA-	196
168_BS	AGTCATCTCACCACCTCTTTGGGGAATAAGTTGTTTATGAGTCAGAAACCTATAAAAAA	357
AF469936_BL	AGAGTATCGGCGGTCTTTTT-----TAGCCGTCACTTTACACA-AAAGTTACATAC--	264
	PhoP? PhoP?	
	-35/PhoP -10 +1	
FZB45_BA	-----CTTAACACTGAACCTT-CCTGTATGTATTTTACAATTAAAGTGAACGTTTCAT	336
FZB42_BA	-----CTTAACACTGACATT-CCTGTATGTATTTTACAATTAAAGTACACTTTTCAT	364
U85968_DS11	-----CTTAACACTGAACCTT-CCTGTATGTATTTTACAATTAAAGTGACGTTTCAT	263
AF029053_BS	-----CTTAACACTGACAAT-CATGTATATATGTACAATTGAAGTGACGTTTCAT	74
AF453255_BA	-----CTTAACACTGACAAT-CATGTATGTATTTTACAATTGAAGTGACGTTTCAT	246
168_BS	AGGTTTCATTTTCTCAGCGTAATCAGCTGTATATTTTACAATTAGTAGTTAGTGATA	417
AF469936_BL	-----CCTCAAAATGATAATT-TTCATTGGTTTGCTAGGATAAATGT-----TAT	307
	RBS Met→	
FZB45_BA	TAAAAGGAGGAAGGAAAATGAATCATTTCAAAAACACT---TTTGTTAACCGCGGCAGCCG	393
FZB42_BA	-AAAAGGAGGAAGGAAAATGAATCATTTCAAAAACACT---TTTGTTAACCGCGGCAGCCG	420
U85968_DS11	-AAAAGGAGGATGGAATAATGAATCATTTCAAAAACACT---TTTGTTAACCGCGGCAGCCG	319
AF029053_BS	-AAAAGGAGGAAGTAAAATGAATCATTTCAAAAACACT---TTTGTTAACCGCGGCAGCCG	130
AF453255_BA	-AAAAGGAGGAAGTAAAATGAATCATTTCAAAAACACT---TTTGTTAACCGCGGCAGCCG	302
168_BS	AAAGAGGAGGTACCAATGAAGTTCCAAAAACAAT---GCTGCTAAGCACTGCCGCGG	474
AF469936_BL	GAAAAGGAGGTTAATATATGAACCTTTTACAAAACGCTCGCTTTATCAACACTCGCAGCAT	367
	***** * ***** * * ** ** *	
FZB45_BA	GATTGATG-CTCACATGCGGTGCGGTTTCTTCCCAGGGCAAGCATAAGCTGTCTGATCCT	452
FZB42_BA	GATTGATG-CTCACATGCGGTGCGGTTTCTTCCCAGGGCAAGCATAAGCTGTCTGATCCT	479
U85968_DS11	GATTGATG-CTCACATGCGGTGCGGTTTCTTCTCAGGCCAAACATAAGCTGTCTGATCCT	378
AF029053_BS	GACTGATG-CTCACATGCGGTGCGGTGCTTCTTCCCAGGCCAAAGCATAAGCTGTCCGATCCT	189
AF453255_BA	GACTGATG-CTCATGCGGTGAGGTGCTTCTTCCCAGGCCAAACATAAGCTGTCTGATCCT	361
168_BS	GTTTATG-CTTA---GCCTGACAGCAACCTCGGTGTCGGCTCATTATGTGAATGAGGAA	530
AF469936_BL	CCTTATGGTCTCCCTCATGGAGCAGTCTCCCCATAACGAAGCTGCGGCTCACAAAG---	424
	* * * * *	

ANHANG

FZB45_BA	TATCACTTTACCGTGAATGCGGCGGCGGAAACGGAGCCGGTTGATACAGCCGGTGATGCA	512
FZB42_BA	TATCATTTTACCGTGAATGCGGCGGCGGAAACGGAAACCGGTTGATACAGCAGGTGATGCA	539
U85968_DS11	TATCATTTTACCGTGAATGCGGCGGCGGAAACGGAGCCGGTTGATACAGCCGGTGATGCA	438
AF029053_BS	TATCATTTTACCGTGAATGCAGCGGCGGAAACGGAAACCGGTTGATACGGCCGGTGACGCG	249
AF453255_BA	TATCATTTTACCGTGAATGCGGCGGCGGAAACGGAAACCGGTTGATACGGCCGGTGACGCG	421
168_BS	CATCATTTCAAAGTGACTGCACACACGGAGACAGATCCGGTCGCATCTGGCGATGATGCA	590
AF469936_BL	----AATTCACGGTGACTGCCGATGCAGAGACAGAGCCGGTGATACCCCTGACGACGCG	480
	* * * * *	
FZB45_BA	GCTGATGATCCTGCGATTTGGCTGGCTCCCAAGAATCCTCAGAACAGCAAATTGATCACA	572
FZB42_BA	GCTGATGATCCTGCGATTTGGCTGGACCCCAAGAATCCTCTGAACAGCAAATTGATCACA	599
U85968_DS11	GCTGATGATCCTGCGATTTGGCTGGACCCCAAGAATCCTCAGAACAGCAAATTGATCACA	498
AF029053_BS	GCTGATGATCCTGCGATTTGGCTGGACCCCAAGACTCCTCAGAACAGCAAATTGATTACG	309
AF453255_BA	GCTGATGATCCTGCGATTTGGCTGGACCCCAAGACTCCTCAGAACAGCAAATTGATTACA	481
168	GCAGATGACCCGGCCATTTGGGTTTCATGAAAAACACCCGGAAAAAAGCAAGTTGATTACA	650
AF469936_BL	GCAGATGACCCGGCGATTTGGGTTTCATCCGAAGCAGCCTGAGGATAGCAGGCTCATCACC	540
	** * * * *	
FZB45_BA	ACCAATAAAAAATCAGGCTTAGTCGTGTACAGCCTAGAGGGAAAGACGCTTCATTCCCTAT	632
FZB42_BA	ACCAATAAAAAATCAGGCTTAGTCGTGTACAGCCTAGAGGGAAAGATGCTTCATTCCCTAT	659
U85968_DS11	ACCAATAAAAAATCAGGCTTAGCCGTGTACAGCCTAGAGGGAAAGATGCTTCATTCCCTAT	558
AF029053_BS	ACCAATAAAAAATCAGGTTTAGTCGTGTACAGCCTTAGATGGTAAGATGCTTCATTCCCTAT	369
AF453255_BA	ACCAATAAAAAATCAGGTTTAGTCGTGTACAGCCTCGATGGTAAGATGCTTCATTCCCTAT	541
2078	ACCAATAAAAAATCAGGTTTAGTCGTGTACAGCCTCGATGGTAAGATGCTTCATTCCCTAT	279
168_BS	ACAAATAAGAAGTCAGGGCTCGTTGTGTATGATTAGACGGAAAAACAGCTTCATTCTTAT	710
AF469936_BL	ACAAACAAAAAGTCGGGCTTAATCGTCTATGATTGAAGGGAAAAACAGTTGCGGCCCTAT	600
	** * * * *	
FZB45_BA	CATACCGGGAAGCTGAACAATGTTGATATCCGCTATGATTTTCCGTTGAACGGAAAAAAA	692
FZB42_BA	CCTACCGGGAAGCTGAACAATGTTGATATCCGCTATGATTTTCCGTTGAACGGAAAAAAA	719
U85968_DS11	CATACCGGGAAGCTGAACAATGTTGATATCCGATATGATTTTCCGTTGAACGGAAAAAAA	710
AF029053_BS	AATACCGGGAAGCTGAACAATGTCGATATCCGTTATGATTTTCCGTTGAACGGCAAAAAA	429
AF453255_BA	AATACCGGGAAGCTGAACAATGTCGATATCCGTTATGATTTTCCGTTGAACGGAAAAAAA	601
168_BS	GAGTTTGGCAAGCTCAATAATGTCGATCTGCGCTATGATTTTCCATTGAACGGCGAAAAA	770
AF469936_BL	CCGTTTGGCAAATTAACCAATGTCGACCTGCGCTACAATTTTCCGCTCGATGGCAAAAAA	660
	** * * * *	
FZB45_BA	GTCGATATTGCGGCGGCATCCAATCGGTCTGAAGGAAAGAATACCATTTAGATTTACGCC	752
FZB42_BA	GTCGATATTGCGGCGGCATCCAATCGGTCTGAAGGAAAGAATACCATTTAGATTTACGCC	779
U85968_DS11	GTCGATATTGCGGCGGCATCCAATCGGTCTGAAGGAAAGAATACCATTTAGATTTACGCC	678
AF029053_BS	GTCGATATCGCGGCAGCATCCAATCGGTCTGAAGGAAAAAATACCATTTAGATTTACGCT	489
AF453255_BA	GTCGATATCGCGGCAGATCCCAATCGGTCTGAAGGAAAAAACGCCATTGAGATTTACGCC	661
168_BS	ATTGATATTGCTGCCGCATCCAACCGGTCCGAAGGAAAAAATACAATTGAAGTATATGCA	830
AF469936_BL	ATTGATATTGCGGCGGCCTCAAAACCGGTCCAGCGCAAAAAACACGGTTGAATTTACGCC	720
	* * * * *	
FZB45_BA	ATTGACGGGAAAAACGGGCACATTACAAGCATTACAGATCCAGACCGCCCGATTGCATCA	812
FZB42_BA	ATTGACGGGAAAAACGGGCACATTACAAGCATTACGAACCCAGACCGCCCGATTGCGTCA	839
U85968_DS11	ATTGACGGGAAAAACGGGCACATTACAAGCATTACGGATCCAAACCGCCCGATTGCATCA	738
AF029053_BS	ATTGATGGAAAAACGGGCACATTACAAGCATGACAGATCCAGACCATCCGATTGCAACA	549
AF453255_BA	ACTGACGGGAAAAACGGGCACATTGCAAGCATAACAGATCCAGACCATCCGATTGCATCA	721
168_BS	ATAGACGGGGATAAAGGAAAAATTGAAGCATTACAGATCCGAACCATCCTATTTCACC	890
AF469936_BL	TTTGACGGCGAAAAAGCAAGCTGAAGAACATCGTCAATCCTCAAAAACCTATTCAAACC	780
	** * * * *	
FZB45_BA	GCAATTGATGAAGTATACGGTTTCAGCTTGTACCACAGTCAAAAAACAGGAAAAATATTAC	872
FZB42_BA	GCAATTGATGAAGTATACGGTTTCAGCTTGTACCACAGTCAAAAAACAGGAAAAATATTAC	899
U85968_DS11	GCAATTGATGAAGTATACGGTTTCAGCTTGTACCACAGTCAAAAAACAGGAAAAATATTAC	798
AF029053_BS	GCAATTAATGAGGTATACGGTTTACCTTATACCACAGTCAAAAAACAGGAAAAATATTAC	609
AF453255_BA	GCAATTAATGAGGTATACGGTTTACCTTATACCACAGTCAAAAAACAGGAAAAATATTAC	781
168	AATATTCTGAGGTTTATGGATTAGCTTGTATCACAGCCAGAAAAACAGGAGCATTTTAC	950
AF469936_BL	GATATCCAGGAGGTATATGGCTTCAGCCTGTATCACAGCCAGAAAAACGGCAAGTTCTAC	840
	** * * * *	
FZB45_BA	GCGATGGTGACAGGGAAAGAAGGCGAATTTGAACAATACGAATTAATGCGGATAAAAAAT	932
FZB42_BA	GCGATGGTGACAGGGAAAGAAGGCGAATTGAACAATACGAATTAATGCTGATAAAAAAT	959
U85968_DS11	GCGATGGTGACAGGAAAGAAGGCGAATTTGAACAATACGAATTAATGCGGATAAAAAAT	858
AF029053_BS	GCGATGGTGACAGGAAAGAGGGTGAATTTGAACAATACGAATTAAGGCGGCACAAAAAT	669
AF453255_BA	GCGATGGTGACAGGAAAGAGGGTGAATTTGAACAATACGAATTAAGGCGGCACAAAAAT	841
168_BS	GCATTAGTGACAGGCAACAAGGGGAATTTGAGCAGTATGAAATTGTTGATGGTGGAAG	1010
AF469936_BL	GCCATGGTGACCGGAAAGAACGGCGAATTCGAGCAATATGAACCTGTTTGACAACGGAAAA	900
	** * * * *	
FZB45_BA	GGATACATATCCGGCAAAAAGGTAAGGGCGTTTAAAAATGAATTCTCAGACAGAAGGGATG	992
FZB42_BA	GGATACATATCCGGCAAAAAGGTAAGGGCGTTTAAAAATGAATTCTCAGACAGAAGGGATG	1019
U85968_DS11	GGATACATATCCGGCAAAAAGGTAAGGGCGTTTAAAAATGAATTCTCAGACAGAAGGGATG	918
AF029053_BS	GGATACATATCCGGCAAAAAGGTACGGGCGTTTAAAAATGAATTCAGACAGCGGAAGGGATG	729
AF453255_BA	GGATACATATCCGGCAAAAAGGTACGGGCGTTTAAAAATGAATTCAGACAGCGGAAGGGATG	901
168_BS	GGTTATGTAACAGGAAAAAGGTGCGTGAATTTAAGTTGAATTCTCAGACCGAAGGCCCTT	1070
AF469936_BL	GGACAAGTCGAGGGCAAAAAGGTCCGCTCATTCAAAATGAGCTCTCAACAGAGAAGGGCTT	960
	** * * * *	

ANHANG

FZB45_BA	GCAGCAGACGATGAATACGGCAGTCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATCTGGAAG	1052
FZB42_BA	GCAGCAGACGATGAATACGGCAGTCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATCTGGAAG	1079
U85968_DS11	GCAGCAGACGATGAATACGGCAGTCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATCTGGAAG	978
AF029053_BS	GCAGCAGACGATGAATACGGCAGGCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATTTGGAAG	789
AF453255_BA	GCAGCAGACGATGAATACAGCAGGCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATTTGGAAC	961
168_BS	GTTGCGGATGATGAGTACGGAACCTATACATAGCAGAGGAAGATGAGGCCATCTGGAAG	1130
AF469936_BL	GCGGCAGATGATGAATACGGCAAAATGTACATCGCCGAAGAAGACGTTGCGATTTGGTCT	1020
	* * * * *	
FZB45	TTCAGCGCTGAGCCGGACGGCGGCAGTAACGGAACGGTAATCGATCGTGCCGACGGCAGG	1112
FZB42_BA	TTCAGCGCTGAGCCGGACGGCGGCAGTAACGGAACGGTTATCGATCGTGCCGACGGCAGG	1139
U85968_DS11	TTCAGCGCTGAGCCGGACGGCGGCAGTAACGGAACGGTTATCGATCGTGCCGATGGCAGG	1038
AF029053_BS	TTCAGCGCCGAGCCGGACGGCGGCAGTAACGGAACGGTTATCGACCGTGCCGACGGCAGG	849
AF453255_BA	TTCAGCGCCGAGCCGGACGGCGGCAGTAACGGAACGGTTTTTCGACCGTGCGGACGGCAGG	1021
168_BS	TTTAAACGCTGAGCCCGGCGGAGGTCAAAGGGGCAGGTTGTTGACCGTGCGACAGGAGAT	1190
AF469936_BL	TTCAGCGCCGAGCCGGACGGCGGAGATAAAGGAAAAATCGTTCGATCGTGCCGACGGACCG	1080
	* * * * *	
FZB45_BA	CATTTAACCCCTGATATTGAAGGACTGACGATTTACTACGCTGCTGACGGGAAAGGTTAT	1172
FZB42_BA	CATTTAACCCCTGATATTGAAGGACTGACGATTTACTACGCTGCTGACGGGAAAGGTTAT	1199
U85968_DS11	CATTTAACCCCTGATATTGAAGGACTGACGATTTACTACGCTGCTGACGGGAAAGGCTAT	1098
AF029053_BS	CATTTAACTCGTGATATTGAAGGATTGACGATTTACTACGCTGCTGACGGGAAAGGCTAT	909
AF453255_BA	CATTTAACTCCTGATATTGAAGGDTTGACGATTTATTACGCTGCTGACGGGAAAGGCTAT	1081
168_BS	CATTTGACAGCTGATATTGAAGGACTGACAATCTATATGCACCAATGGCAAAGGATAT	1250
AF469936_BL	CATCTAACTCTGATATTGAAGGGCTGACGATTTACTACGGAGAAGACGGAGAAGGGTAC	1140
	* * * * *	
FZB45_BA	CTGCTTGCATCAAGCCAGGGTAACAGCAGCTACGCGATTTATGAAAGACAGGGACAGAAC	1232
FZB42_BA	TTGCTTGCATCAAGCCAGGGTAACAGCAGCTACGCGATTTATGAAAGACAGGGACAGAAC	1259
U85968_DS11	CTGCTTGCCTCAAGCCAGGGTAACAGCAGCTATGCGATTTATGAAAGACAGGGACAGAAC	1158
AF029053_BS	CTGATGGCATCAAGCCAGGGAAACAGCAGCTACGCCATTTATGACAGACAAGGAAAGAAC	969
AF453255_BA	CTGATGGCCTCAAGCCAAGGCAACAACAGCTACGCCATTTATGACAGACAAGGAAAGAAC	1141
168_BS	CTCATGGCTTCAAGTCAAGGAAATAACAGCTATGCAATGTATGAAACGGCAGGGGAAAAAT	1310
AF469936_BL	TTGATCGCGTCCAGTCAGGGCGATGACCGCTATGCCATCTATGACCGGCGCGGGAAAAAC	1200
	* * * * *	
FZB45_BA	AAATATGTGCGGACTTTCAGATAACAGACGGGCTGAAACAGACGGCACAAAGCGATACA	1292
FZB42_BA	AAATATGTTGCGGACTTTCAGATAACAGACGGGCTGAGACAGACGGCACAAAGCGATACA	1319
U85968_DS11	AAATATGTTGCGGACTTTCAGATAACAGACGGGCTGAAACAGACGGCACAAAGCGATACA	1218
AF029053_BS	AAATATGTTGCGGATTTTCGATATAACAGACGGTCTCTGAAACAGACGGGACAAAGCGATACA	1029
AF453255_BA	AAATATGTTGCGGATTTTCGATATAACAGACGGTCTCTGAAACTGACGGCACAAAGCGATACA	1201
168_BS	CGCTATGTAGCCAACCTTTGAGATTACAGATGGCGAGAAGATAGACGGTACTAGTGACACG	1370
AF469936_BL	GACTACGTCCTGCTTTTCAATTGAGGACGGCAAGAAATCGACGGGACAAAGCGATACC	1260
	* * * * *	
FZB45_BA	GACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGGCTGGGGCTGAAATATCCGTTCCGGCTTTTTTGTC	1352
FZB42_BA	GACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGGCTGGGACCTGAAATATCCGTTCCGGCTTTTTTGTC	1379
U85968_DS11	GACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGGCTGGGGCTGAAATATCCGTTCCGGCTTTTTTGTC	1278
AF029053_BS	GACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGACTGGGGCTGAAATATCCGTTCCGGTATTTTTTGTC	1089
AF453255_BA	GACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGACTGGGGCTGAAATATCCGTTCCGGTATTTTTTGTC	1261
168_BS	GATGGTATTGATGTTCTCGGTTTCGGACTTGGCCAAAATATCCGTACGGGATTTTTTGTC	1430
AF469936_BL	GATGGAATCGACGTCATCGGCTTCGGCTCGGCAAAACATATCCATACGGCATCTTTGTC	1320
	* * * * *	
FZB45_BA	GCACAGGATGGAGAAAAATATAGATCACGGCCAAAAGTGAATCAAAATTTTAAAATGGTG	1412
FZB42_BA	GCACAGGACGGAGAAAAATATAGATCACGGCCAAAAGGCCAATCAAAATTTTAAAATGGTG	1439
U85968_DS11	GCACAGGACGGAGAGAAATATAGATCACGGCCAAAAGGCCAATCAAAATTTTAAAATGGTG	1338
AF029053_BS	GCACAGGACGGTGAAAAATATAGATCACGGCCAAAAGGCCAATCAAAATTTTAAAATCGTG	1149
AF453255_BA	GCACAGGACGGTGAAAAATATAGATCACGGCCAAAAGGCCAATCAAAATTTTAAAATCGTG	1321
168_BS	GCGCAGGACGGCGAAAAATATTGATAACGGACAAGCCGTCAATCAAAATTTTAAAATTGTA	1490
AF469936_BL	GCCCCAAGACGGCGAAAAATACGGAATAAGGGCAACCGGCCAATCAGAACTTCAAAATTGTC	1380
	* * * * *	
FZB45_BA	CCTTGGGAAAGAATCGCCGATAAAATCGGCTTTCACCCGACGGTCAATAAACAGGTTGAC	1472
FZB42_BA	CCTTGGGAAAGAATCGCTGATAAAATCGGCTTTCACCCGACGGTCAATAAACAGGTTGAC	1499
U85968_DS11	CCATGGGAAAGAATCGCTGATAAAATCGGCTTTCACCCGACGGTCAATAAACAGGTTGAC	1398
AF029053_BS	CCATGGGAAAGAATTGCTGTATCAAAATCGGTTTCCGCCCCGCTGGCAATGAACAGGTTGAC	1209
AF453255_BA	CCGTGGGAAAGAATTGCTGTATCAAAATCGGTTTCCGCCCCGCTGGCAATGAACAGGTTGAC	1381
168_BS	TCGTGGGAACAAAATGTCACAGCATCTCGGCGAAATGCCTGATCTTCATAAACAGGTTAAAT	1550
AF469936_BL	TCCTGGGAAAAAATCGCCGACGCGTGGACGACAAACCTGATATCGATCAGGTCGAT	1440
	* * * * *	
	Stop Terminator	
FZB45_BA	CCGAGAAAACCTGACCGACAGAAGCGGAAAAATAACATAAAAAAGGAGCTTATCCAAGCT	1532
FZB42_BA	CCGAGAAAACCTGACTGACAGAAGCGGAAAAATAACATAAAAAAGGAGCTTATCCAAGCT	1559
U85968_DS11	CCGAGAAAAATGACCGACAGAAGCGGAAAAATAACATAAAAAAGGAGCTTATCCAAGCT	1458
AF029053_BS	CCGAGAAAACCTGACCGACAGAAGCGGAAAAATAACATGCAAAAAAGCAGCTTATACAAGCT	1269
AF453255_BA	CCGAGAAAACCTGACCGACAGAAGCGGAAAAATAAGGA-----	1417
168_BS	CCGAGGAAGCTGAAAGACCGTTCTGACGGCTAGAG---ATAGAAAGCAGCTTGTGCAGCTG	1607
AF469936_BL	CCCCGAAAACCTGAAAAACCGAGCCAAATAAGGA-----	1473
	* * * * *	

ANHANG

FZB45_BA	GTTTTTTTGATG-----TGAAGAGCGTTTCATGAGAAAGTCCTGG	1572
FZB42_BA	GCTTTTT-GATG-----TGAAGAGCGTTTCATGAGAAAGTCTTGG	1598
U85968_DS11	GCTTTTT-GATG-----TGAAGAGCGTTTCATGAGAAAGTCTTGG	1497
AF029053_BS	GCTTTTTGCATG-----TGAAGAACG-----	1290
AF453255_BA	-----	
168_BS	CTTTTTTCTATGAATAAAAAAATCGTTCATAGCAATGAACGATTTTCAAGAAAGCGCCA	1667
AF469936_BL	-----	
FZB45_BA	AACGGATAGCCGCAAGCACAGCCGGCAGCCGGTCATACGTGTACGCCGGTACTGTCTCTT	1632
FZB42_BA	AACGGATAGCCGAAAGCACAGCCGGCAGCCGGTCATACGTGTACGCCGGTACTGTCTCTT	1658
U85968_DS11	AACGGATAGCCGTAAGCACAGCCGGCAGCCGGTCATACGTGTACGCCGGTACTGTCTCTT	1557
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	-----	
168_BS	GATGAATCGCTTTTAGTTTTGCAGGAAGCTCATCAAACGTAAATGCGGGTACGGTCTCTT	1727
AF469936_BL	-----	
FZB45_BA	GGTAATTAAGCGCCGCGATTGTGTTACGTTACCCGGGTTTGTCATATAAAAAATGGATCT	1692
FZB42_BA	GGTAATTAAGCGCCGCGATTGTGTTACGTTACCCGGGTTTGTCATATAAAAAATGGATCT	1718
U85968_DS11	GATAATTAAGCGCCGCGATTGTGTTACGTTACCCGGGTTTGTCATATAAAAAATGGATCT	1617
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	-----	
168_BS	TATAATTGGCTGCTGCAGCTTTTTCGCGTTCTTCAGGGTGGTTGATATAGAAAGCGGCTT	1787
AF469936_BL	-----	
FZB45_BA	TATCCGCAAAATCCGCAAGCCCGCTGTAAGAAACAAAGGATGAAAACGGGGGCGCGGAAG	1752
FZB42_BA	TATCCGCAAAATCCGCAAGCCCGCTGTAAGAAACAAAGGATGAAAATGGGGGCGCGGGAG	1778
U85968_DS11	TATCCGCAAAATCCGCAAAACCCGCTGTAAGAAACAAATGTTGAAAACGGGGGCGCGGGAG	1677
AF029053_BS	-----	
AF453255_BA	-----	
168_BS	TTTCCTTAAAGTCGTTTCATGCCGTGATAAGAAATAATGGATGAAAAGGATGCGCCGCGG	1847
AF469936_BL	-----	

7.2.2 Vergleiche der Proteinsequenzen aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens*



Abbildung 7.9: Vergleich der PhyC-Aminosäuresequenzen der Phytasen aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 und *B. subtilis* 168. Identische AS sind rot dargestellt; AS die sich im aktiven Zentrum befinden sind blau gekennzeichnet (nach Shin et al., 2001). Oberhalb der Sequenz sind die Bereiche, welche die einzelnen Schneiden der β -Propeller-Struktur bilden farbig dargestellt. Das Signalpeptid ist grau markiert. Wie man hier erkennen kann, sind die AS des aktiven Zentrums konserviert. Beide Proteine zeigen eine 71 %-ige Homologie.

BS MFMKSTGIVRKVDELGRVVIPIELRRTLGLIAEKDALEIYVDDEKIILKKYKPNMTCQVTG 60
FZB42 --MKSTGIVRKVDELGRVVIPIELRRTLGLIAEKDALEIYVDDEKIILKKYKPNMTCQVTG 58

BS EVSDDNLKLAGGKLVLSKEGAEQIISEIQNLQNLK 96
FZB42 EVSDDNLKLAGGKLVLSKEGAEQIISEIQNLQNLQK 94

Abbildung 7.10: Vergleich der AbrB-Sequenzen aus *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42, einem engen Verwandten von FZB45. Das AbrB-Protein scheint sehr stark konserviert zu sein, deshalb kann davon ausgegangen werden, dass dieses Protein auch in *B. amyloliquefaciens* FZB45 sich nicht sonderlich von diesen beiden unterscheiden sollte.

BS168	MKLMRIQEMEEYILSHGTVSLDELQCQVFNVSKNTVRRDINKLTEKGAIEKVYGGVTSIEK	60
FZB42	MKLMRIQEMEEYILKHGATSLDELCEVFNVSKNTVRRDINKPAEKGVIKKVYGGVTSAEK	60
BS168	TALVPFENRTIQHQDEKTKIAHYASRFIEDHDLVFIDSGTTTKSILDTLDPKAKNVTILT	120
FZB42	SVLVPFENRTIQHQDDTIKIARYASRFIEDHDLVFIDSGTTTKSMLTLDPKAKNVTILT	120
BS168	SLDIINAASALKNINLIIIGNNYKRKTRSFVGMDDPAMLDKYNINKAFMSATGTTTLTHGL	180
FZB42	SLDIINAASSMKNIDLIIIGNNYKRKTRSFVGIDDPSTLNKYNINKAFMSATGTTTITHGL	180
BS168	TNSDLLEYEIKKRRISEKAKEVYLLADHSKFGKSTLLTYAPFDRHLHCIVTSQPLDDEYTY	240
FZB42	TNSDLLEYEVKKRISEKANEVYLLADHSKFGKSTLLTYAPFDRHLHSIVTSQQLDDEYTKY	240
BS168	CNEHQIGIHLA	251
FZB42	CQEHQIDIHLA	251

Abbildung 7.11: Vergleich der lolR-Sequenzen aus *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB42, einem engen Verwandten von FZB45.

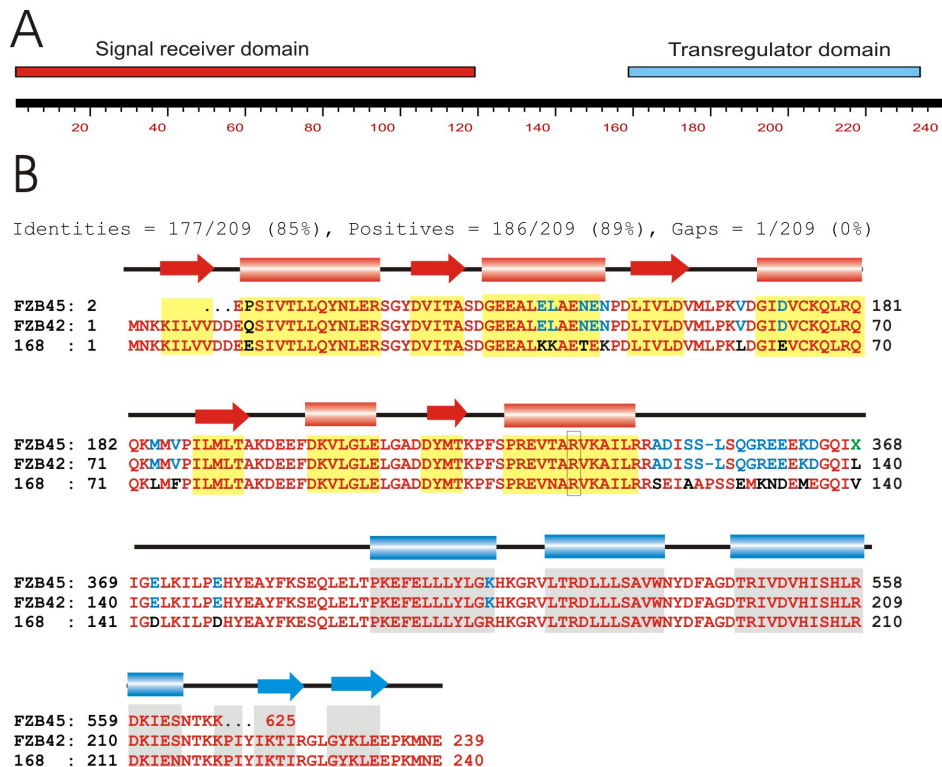


Abbildung 7.12: Alignment zwischen der PhoP-Sequenz aus *B. subtilis* 168 und der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten *phoP*-Teilsequenz aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 und FZB42. Die Sequenz wurde mit den PhoP4 und PhoP5-Primern aus der chromosomalen DNA von FZB45 amplifiziert, in pGEMT kloniert und mit dem Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit sequenziert. Oben ist die Proteinstruktur von PhoP aus *B. subtilis* mit der Phosphorylierungsdomäne und der DNA-Bindedomäne (Transregulatordomäne) dargestellt. Wie hier deutlich zu erkennen ist, sind die Sequenzen sehr stark homolog, nur in der ‚Linkerregion‘, zwischen den beiden Domänen, unterscheiden sich die PhoP-Proteine aus *B. amyloliquefaciens* und *B. subtilis* stärker von einander.

Veröffentlichungen

Diplomarbeit: Regulation der Phytaseexpression in *Bacillus subtilis*

Oliwia Makarewicz
März 2001

Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45
contributes to its plant-growth-promoting effect.

Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, B., Richter,
R., Borriss, R.

Microbiology 2002, Vol. 148: 2097–2109

Dual role of the PhoP~P response regulator: *Bacillus amyloliquefaciens*
FZB45 phytase gene transcription is directed by positive and negative
interactions with the *phyC* promoter

Makarewicz, O., Dubrac, S., Msadek, T., Borriss, R.

Journal of Bacteriology, Publikation im Druck,
Erscheinungsdatum: Oktober 2006, Vol. 188

Lebenslauf

Oliwia Makarewicz

Persönliche Angaben

Vorname	Oliwia
Name	Makarewicz
Geburtsdatum	31.07.1974
Geburtsort	Schwerin
Nationalität	Polnisch

Schulischer Werdegang

1980-1986	Besuch der Grundschule in Olecko, Polen
1986-1988	Besuch der Otto-Wels-Grundschule in Berlin
1988-1992	Besuch der Carl-von-Ossietzky-Gesamtschule in Berlin
1992-1995	Besuch der Lise-Meitner-Oberschule in Berlin (Oberstufenzentrum für Naturwissenschaften),
Mai 1995	Abschluss mit Abitur
1995-2001	Studium in der Fachrichtung Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin
2000- 2001	Diplomarbeit am Institut für Biologie in der AG Bakteriengenetik
März 2001	Diplomabschluss
2001-2006	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biologie in der AG Bakteriengenetik
April 2003	Anmeldung des Promotionsvorhabens im Fach Biologie

Danksagungen

An erster Stelle danke ich Prof. R. Borriss für die Überlassung des Themas und die Betreuung.

Der Arbeitsgruppe Bakteriengenetik möchte ich für die Unterstützung und das nette Arbeitsklima danken. Mein besonderer Dank gebührt Christiane Müller, nicht nur für Ihre Unterstützung durch die Sequenzierungsarbeiten und Ihre Hilfe bei den Kulturen, sondern auch für Ihr geduldiges 'Ohr'. Ein weiterer Dank geht an Markus Wilhelms, der im Rahmen seiner Diplomarbeit einen großen Beitrag zur dieser Arbeit geleistet hat.

Ganz besonders möchte ich auch der Arbeitsgruppe um Tarek Msadek (Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram Positif) von Institut Pasteur danken. An dieser Stelle sei Sarah Dubrak für die Unterweisung in die Footprinttechnik und die *In vitro* Transkription, sowie Michel Debarbouille für so manche zündende Idee gedankt. Natürlich möchte ich auch Tarek Msadek für die herzliche Aufnahme in seiner AG und seine Unterstützung danken. Auch Christine Dugast möchte ich für Ihre große Hilfe bei den bürokratischen Angelegenheiten während des Aufenthaltes am Institut Pasteur danken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke dafür, dass Sie mir immer zur Seite stehen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Berlin, 15.05.2006

Oliwia Makarewicz